

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Microbiología III**



**TESIS DOCTORAL**

**Epidemiología molecular del virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico en una población de hombres que practica sexo con hombres (HSH), coinfectados o no con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Montserrat Torres Hortal**

DIRECTORES:

**Marta, dir Ortiz Rivera**  
**Alfredo, dir García Saiz**

**Madrid, 2015**

627193706



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5329988141

T578.827.11  
TOR  
epi

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Biología  
Departamento de Microbiología III



**Epidemiología Molecular del Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo Oncogénico en una Población de Hombres que Practican Sexo con Hombres (HSH), Coinfectados o no con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1).**

Tesis Doctoral

Montserrat Torres Hortal



Madrid, 2011

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Biología  
Departamento de Microbiología III



**Epidemiología Molecular del Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo Oncogénico en una Población de Hombres que Practican Sexo con Hombres (HSH), Coinfectados o no con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1).**

Memoria presentada por Montserrat Torres Hortal  
Para optar al grado de Doctor en Biología

Dirigida por los Doctores:  
**Marta Ortiz Rivera**  
**Alfredo García Sáiz**

## Agradecimientos

Al Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, por ofrecerme la posibilidad de realizar este trabajo.

Muy especialmente, a la Dra. Marta Ortiz, directora de esta tesis, por su generosa dedicación y su esfuerzo continuo que han hecho de esta etapa un recorrido inolvidable. Gracias por hacer de tu brillante capacidad investigadora un ejemplo a seguir para mí.

Al Dr. Alfredo García Sáiz, director de esta tesis, por abrirme las puertas de mi primer laboratorio y permitirme contar con su dilatada experiencia en el mundo de la ciencia.

A la Dra. Ascensión Bernal Zamora, por brindarme la posibilidad de iniciar mi carrera profesional.

A mis compañeras del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, especialmente a la Dra. Cristina González Blázquez, por su ayuda en la realización de este trabajo. Gracias por ser una gran compañera de proyectos.

A la Dra. Beatriz Hernández Novoa, por su exquisita y cuidadosa revisión de este trabajo. Es un lujo contar con tus aportaciones.

A la Universidad Complutense de Madrid, especialmente a la Dra. Laura Benítez Rico, por la ayuda prestada estos años y con la excelente revisión de este trabajo; y a la Dra. M<sup>a</sup> José Valderrama Conde, por facilitarme amablemente la tramitación de mi tesis doctoral.

Al Centro Sanitario Sandoval de Madrid, por el interés y la importante aportación en la realización de este trabajo.

A Ángeles Pablos Martín, por enseñarme desde el primer día y no haberse ido nunca, y a Esther, por estar siempre dispuesta a compartir algo más que un café.

A mis compañeras de la Unidad de Retrovirus y Papilomavirus, M<sup>a</sup> Angeles, M<sup>a</sup> Carmen, Marisa, Sonsoles, Lucía y M<sup>a</sup> José, por su interés en este trabajo.

A mis compañeras de doctorado, Alejandra, Virginia, Ana y Carolina, que han sufrido conmigo este “período de formación”.

A mis amigos, que han vivido este trabajo con la misma intensidad que yo..

A mi gran familia, que me acompaña en todos los momentos y es el pilar de mi vida. A mi madre, por la tenacidad; a mi padre, por la confianza. A mis hermanas, mis compañeras inseparables. A mis sobrinos, la alegría de mi vida.

A mi compañero, por haberme brindado de forma tan generosa parte de nuestro tiempo para realizar este trabajo. Compartir la vida contigo es un regalo. Gracias a vuestro ánimo y aliento este trabajo ha sido más fácil.

...Y a todas las personas que, de alguna manera, han colaborado y participado en la realización de esta tesis doctoral.



La realización de este trabajo ha sido posible gracias a los Proyectos de Investigación MPY1117/03 (Programa Intramural) y MPY1357/07, concedidos por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (Madrid), y al Proyecto de Investigación MPY1421/06, concedido por la Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA (FIPSE).

**A Esteban, A mi familia**

"La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos"

Albert Einstein (1879-1955)





**A<sub>260</sub>, A<sub>280</sub>:** Absorbancia a 260 y 280 nanómetros  
**AA:** Asiático-Americana  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**Af:** Africana  
**Af-1:** Africana tipo 1  
**Af-2:** Africana tipo 2  
**AIN:** Neoplasia anal intraepitelial (*Anal Intraepithelial Neoplasia*)  
**AP-1:** Proteína activadora 1 (*Activator Protein 1*)  
**AR:** Alto riesgo oncogénico  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero  
**As:** Asiática  
**AsAi:** Asiático-Amerindia  
**ATCC:** Colección Americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*)  
**ATP:** Adenosíntrifosfato  
**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*  
**BR:** Bajo riesgo oncogénico  
**C/EBP:** Proteína de unión al potenciador CCAAT (*CCAAT Enhancer Binding Protein*)  
**CIN:** Neoplasia cervical intraepitelial (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*)  
**ddNTPs:** Dideoxinucleótidos trifosfato  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**E:** Europea  
**E:** Temprana (*Early*)  
**E2BS:** Secuencias de unión de E2 (*E2 Binding Sequences*)  
**E6AP:** Proteína asociada a E6 (*E6 Associated Protein*)  
**EDTA:** Ácido etildiaminotetraacético  
**EGRF:** Receptor del factor de crecimiento epitelial (*Epidermal Growth Factor Receptor*)  
**ELISA:** Enzimoimmunoanálisis en fase sólida (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)  
**EMEA:** Agencia Europea de los Medicamentos (*European Medicines Agency*)  
**ETS:** Enfermedades de transmisión sexual  
**FDA:** *Food and Drug Administration*  
**GRE:** Elemento de respuesta a glucocorticoides (*Glucocorticoid Response Elements*)  
**HSH:** Hombres que practican sexo con hombres  
**HSIL:** Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (*High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*)  
**IARC:** Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*)  
**IC95%:** Intervalo de confianza al 95%  
**ITS:** Infección de transmisión sexual  
**KDa:** Kilodalton  
**Kpb:** Kilopares de bases  
**KRF-1:** Factor específico de queratinocitos 1 (*Keratinocyte Specific Transcription Factor 1*)  
**L:** Tardía (*Late*)  
**LCR:** Región larga de control (*Long Control Region*)  
**LSIL:** Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*)  
**ml:** mililitros  
**NF-1:** Factor nuclear 1 (*Nuclear Factor 1*),  
**ng:** nanogramos  
**Oct-1:** Octámero de unión para el factor 1 (*Octamer Binding Transcription Factor 1*)  
**OR:** Razón de riesgo (*Odds Ratio*)

**Ori:** Origen de replicación viral  
**Pb:** Pares de bases  
**PBS:** Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*)  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)  
**pg:** picogramos  
**PV:** Papilomavirus  
**r.p.m.:** Revoluciones por minuto  
**Rb:** Retinoblastoma  
**s:** segundos  
**SIL:** Lesión escamosa intraepitelial (*Squamous Intraepithelial Lesion*)  
**SP-1:** Proteína estimulante de la transcripción 1 (*Specificity Protein 1*)  
**SRY:** Región determinante del sexo del cromosoma Y (*Sex Determining Región Y*)  
**TEF-1/2:** Potenciador de transcripción del factor 1/2 (*Transcriptional Enhancer Factor 1/2*)  
**TMB:** Tetrametilbencidina  
**U.I:** Unidades internacionales  
**USF:** Factor estimulante aguas arriba (*Upstream Transcription Factor*)  
**VIH-1:** Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1  
**VLP:** Partículas semejantes a virus (*Virus Like Particles*)  
**VPH:** Virus del papiloma humano  
**YY-1:** Factor ying-yang 1 (*Factor Yin Yang 1*)  
**µg:** microgramos  
**µl:** microlitros







<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. El virus del papiloma humano.....	1
1.2. Estructura y organización del genoma de VPH.....	1
1.3. Clasificación taxonómica de VPH.....	3
1.4. Ciclo viral.....	6
1.4.1. Unión al receptor celular y entrada viral.....	7
1.4.2. Replicación y transcripción viral.....	7
1.4.3. Ensamblaje y liberación de las partículas virales.....	12
1.5. Patología de la infección por VPH anogenital.....	13
1.5.1. Infección subclínica.....	13
1.5.2. Infección clínica.....	13
1.5.2.1. Verrugas anogenitales.....	13
1.5.2.2. Lesiones precursoras de cáncer en cérvix y ano.....	14
1.5.2.3. Cáncer de cérvix y cáncer de ano.....	14
1.5.2.4. Otros cánceres anogenitales.....	16
1.5.3. Progresión a cáncer de la infección viral.....	17
1.6. Epidemiología de la infección anogenital.....	18
1.6.1. Prevalencia de la infección en mujeres.....	19
1.6.2. Prevalencia de la infección en hombres.....	21
1.6.3. Prevalencia de la infección en mujeres y hombres infectados por VIH.....	21
1.7. Métodos de detección y caracterización de VPH.....	22
1.7.1. Identificación directa.....	22
1.7.1.1. Sistemas de hibridación.....	22
1.7.1.2. Ensayos basados en amplificación por PCR.....	24
1.7.2. Identificación indirecta. Ensayos serológicos.....	26
1.8. Vacunas profilácticas.....	27
1.9. Variantes de VPH.....	28
1.9.1. Significado funcional de las variantes.....	31
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1. MATERIALES.....	41
3.1.1. Controles de laboratorio.....	41
3.1.1.1. Líneas celulares.....	41
3.1.1.2. Muestras clínicas.....	41
3.1.2. Muestras clínicas de estudio.....	41
3.1.3. Medios de cultivo.....	42
3.1.4. Cebadores sintéticos.....	42
3.2. MÉTODOS.....	42
3.2.1. Crecimiento y conservación de las líneas celulares.....	42
3.2.2. Recogida y conservación de las muestras anales.....	42
3.2.3. Detección de ADN de VPH de alto riesgo en las muestras anales mediante el método <i>High-Risk HPV DNA Test®</i> .....	43

3.2.4. Extracción de ADN de las muestras anales y de las líneas celulares.....	44
3.2.5. Medida de la concentración de ácidos nucleicos de los controles de laboratorio mediante espectrofotometría.....	45
3.2.6. Genotipado de VPH mediante <i>Linear Array HPV Genotyping® Test</i> .....	46
3.2.7. Amplificación del ADN de VPH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la caracterización de variantes.....	47
3.2.8. Electroforesis en geles de agarosa.....	50
3.2.9. Purificación de los productos amplificados.....	51
3.2.9.1. Purificación mediante geles de agarosa.....	51
3.2.9.2. Purificación mediante columnas.....	52
3.2.10. Cuantificación de los productos amplificados.....	52
3.2.11. Secuenciación.....	52
3.2.12. Edición y análisis de secuencias.....	53
3.2.13. Análisis filogenético.....	53
3.2.14. Asignación de variantes.....	54
3.2.15. Predicción de los posibles efectos de las mutaciones puntuales en la región reguladora.....	55
3.2.16. Análisis estadístico.....	55
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
4.1. Características de la población de estudio.....	59
4.2. Prevalencia de VPH-AR y distribución de genotipos.....	59
4.3. Análisis de variantes y polimorfismos de genotipos de VPH-AR.....	64
4.3.1. Análisis de variantes de VPH16.....	64
4.3.1.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH16.....	64
4.3.1.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH16.....	66
4.3.1.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6.....	67
4.3.1.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7.....	69
4.3.1.2.3. Polimorfismos en la región reguladora.....	70
4.3.1.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7 y en la región reguladora.....	73
4.3.1.4. Distribución de variantes de VPH16 entre los pacientes.....	74
4.3.1.5. Distribución de variantes de VPH16 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.....	77
4.3.2. Análisis de variantes de VPH18.....	78
4.3.2.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH18.....	78
4.3.2.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH18.....	80
4.3.2.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6.....	80
4.3.2.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7.....	82
4.3.2.2.3. Polimorfismos en la región reguladora.....	83
4.3.2.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7 y en la región reguladora.....	86
4.3.2.4. Distribución de variantes de VPH18 entre los pacientes.....	86
4.3.2.5. Distribución de variantes de VPH18 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.....	89
4.3.3. Análisis de variantes de VPH31.....	91
4.3.3.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH31.....	91

4.3.3.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH31.....	93
4.3.3.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6.....	93
4.3.3.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7.....	94
4.3.3.2.3. Polimorfismos en la región reguladora.....	95
4.3.3.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7 y en la región reguladora.....	97
4.3.3.4. Distribución de variantes de VPH31 entre los pacientes.....	98
4.3.2.5. Distribución de variantes de VPH31 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.....	100
4.3.4. Análisis de variantes de VPH33.....	101
4.3.4.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH33.....	101
4.3.4.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH33.....	102
4.3.4.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6.....	102
4.3.4.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7.....	103
4.3.4.2.3. Polimorfismos en la región reguladora.....	104
4.3.4.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7 y en la región reguladora.....	106
4.3.4.4. Distribución de variantes de VPH33 entre los pacientes.....	107
4.3.4.5. Distribución de variantes de VPH33 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.....	109
4.3.5. Análisis de variantes de VPH52.....	110
4.3.5.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH52.....	110
4.3.5.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH52.....	112
4.3.5.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6.....	112
4.3.5.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7.....	113
4.3.5.2.3. Polimorfismos en la región reguladora.....	114
4.3.5.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de E6 y E7 y en la región reguladora.....	117
4.3.5.4. Distribución de variantes de VPH52 entre los pacientes.....	117
4.3.5.5. Distribución de variantes de VPH52 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.....	119
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
5.1. Prevalencia global y tipo específica de VPH de alto riesgo.....	123
5.2. Prevalencia y caracterización molecular de variantes de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33 y VPH52.....	127
5.3. Influencia de la coinfección con VIH-1 en la distribución de variantes de tipos de VPH de alto riesgo.....	143
5.4. Influencia del origen geográfico de los pacientes en la distribución de variantes de tipos de VPH de alto riesgo.....	145
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>151</b>

<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>155</b>
-----------------------------	------------





## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. EL VIRUS DEL PAPILOMA**

La Familia *Papillomaviridae*, es un grupo de virus conocido desde la antigüedad pero descrito por primera vez a finales del siglo XX (Orth *et al.*, 1977; Coggin *et al.*, 1979). Los papilomavirus (PV) están ampliamente distribuidos en la Naturaleza e infectan a la mayoría de especies de mamíferos, así como a las aves o los reptiles, con un tropismo muy definido por sus hospedadores. La primera secuencia del genoma de un aislado de PV fue clonada con éxito a finales de los años 70 (Orth *et al.*, 1977; zur Hausen *et al.*, 1989) y en la actualidad hay descritos 189 tipos, 120 de los cuales son capaces de infectar al hombre (Bernard *et al.*, 2010).

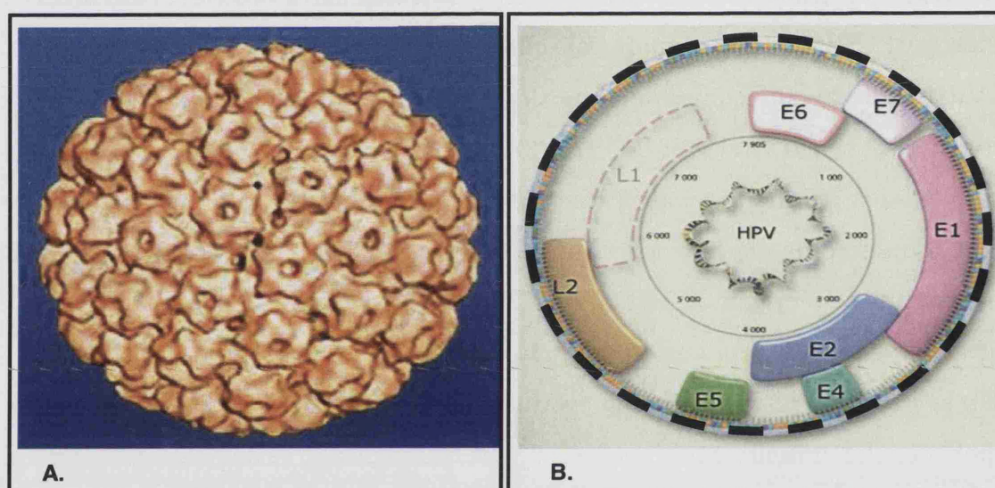
El virus del papiloma humano (VPH) se transmite por contacto e infecta las células basales del tejido epitelial estratificado cutáneo o mucoso. Los tipos de VPH cutáneos tienen un tropismo muy definido por la epidermis e infectan la piel de manos y pies, mientras que los tipos de VPH mucosos infectan el epitelio de la boca, la garganta, el tracto respiratorio y el tracto anogenital. El ciclo viral del VPH está íntimamente unido al programa de diferenciación de las células del tejido epitelial, y las distintas fases del mismo son dependientes y acompañan al proceso de maduración y diferenciación del queratinocito. La infección ocurre a través de abrasiones en el tejido epitelial que exponen las células de la capa basal a la entrada de las partículas virales, y una vez en el interior, aprovechando la maquinaria celular el virus se replica y se propaga, restringiendo la producción de las proteínas y el ensamblaje viral a las capas superiores del epitelio (Middleton *et al.*, 2003; Longworth *et al.*, 2004a). La infección por VPH no produce lisis celular o muerte citopática como consecuencia de la replicación, ensamblaje o la liberación viral debido a que el queratinocito es una célula destinada a la descamación. Además, para permitir la replicación viral, las proteínas virales retrasan la condensación nuclear en los queratinocitos diferenciados (coilocitos), y los queratinocitos “cargados” con el virus mueren así por causas naturales, tal y como está programado en su proceso de diferenciación. De esta forma, la infección por VPH no está acompañada de inflamación, y al no haber una señal obvia de daño (muerte celular) que alerte al sistema inmune de la presencia viral, permite que éste sea ignorado durante periodos muy largos, pudiendo dar lugar a la persistencia o la cronicidad de la infección (Stanley, 2006).

### **1.2. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DE VPH**

El VPH es un virus pequeño, sin envuelta y con una cápsida icosaédrica compuesta de 72 capsómeros, constituidos por dos proteínas estructurales codificadas por el virus (**Figura 1.1.A**). La proteína viral L1 es el elemento estructural primario de la cápsida viral con cinco



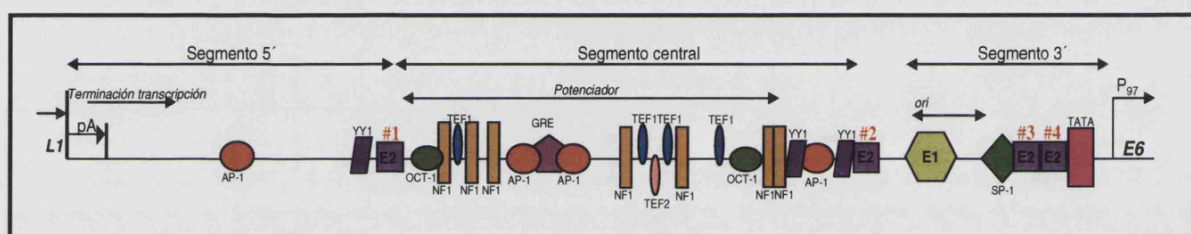
copias por capsómero, tiene un peso molecular de 55 Kilodalton (KDa) y está muy conservada entre los diferentes tipos virales. La proteína viral L2 se localiza como una única molécula en el centro de los capsómeros, tiene un peso molecular de aproximadamente 70 KDa y está menos conservada entre los distintos tipos virales (Finnen *et al.*, 2003). Una característica importante de la proteína L1 es su capacidad de autoensamblarse cuando es expresada en sistemas heterólogos en forma de partículas similares al virus (VLPs, *Virus Like Particles*), en ausencia o presencia de la proteína L2 (Florin *et al.*, 2002). Estas estructuras son similares a los viriones infectivos, tanto en su morfología como en sus epítomos, y han sido empleados en el desarrollo de las vacunas profilácticas frente al VPH (Gardasil® y Cervarix®), por dos razones fundamentales, su alta inmunogenicidad y su inocuidad al carecer de material genético.



**Figura 1.1.** A) Microscopia electrónica de la cápsida viral. B) Mapa genético de VPH16. (Cedido por Qiagen).

El genoma de VPH es ADN de doble cadena, circular, y con una longitud de aproximadamente 8.000 pares de bases (pb). Está organizado en ocho marcos abiertos de lectura que codifican para las proteínas virales, y una región reguladora no codificante conocida como región larga de control (LCR, *Long Control Region*), que presenta numerosos sitios de unión para represores y activadores de la transcripción (**Figura 1.1B**). Durante el ciclo viral, se establece un programa temporal de transcripción para la síntesis de las proteínas de acuerdo con el estado de diferenciación del queratinocito y se distinguen genes de expresión temprana (E, *Early*) y genes de expresión tardía (L, *Late*). Los genes de expresión temprana son expresados en las células no diferenciadas del epitelio y codifican para las proteínas virales no estructurales: E1, E2, E4, E5, E6 y E7, que están implicadas en el control de la replicación, la transcripción y la expresión genética del virus. Su expresión está estrechamente regulada, tanto por factores celulares específicos de tejido como por las propias proteínas virales. Los

genes de expresión tardía son expresados en las células diferenciadas del epitelio y codifican para las proteínas estructurales de la cápsida viral: L1 y L2 (Bekkers *et al.*, 2004). La región reguladora tiene un tamaño que oscila entre 650 y 900 pb, dependiendo del tipo de VPH (Figura 1.2). Para su estudio, la región reguladora puede ser dividida en tres segmentos funcionales: (i) el extremo 5', que contiene las señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación de los transcritos tardíos y tiene una longitud de aproximadamente 300 pb; (ii) el segmento central, que incluye un potenciador específico de tejido con sitios de unión a numerosos activadores y represores de la transcripción y que se extiende en 400 pb aproximadamente; (iii) el extremo 3', que identifica el origen de replicación viral (ori), y que tiene un tamaño aproximado de 140 pb (O'Connor *et al.*, 1995).



**Figura 1.2. Esquema de la región larga de control de VPH.** AP-1, Proteína Activadora 1; YY-1, Factor ying-yang 1; #1/2/3/4, Sitio de unión proteína viral E2; Oct-1, Octámero de unión para el factor 1; NF1, Factor nuclear 1; TEF1/2, Potenciador de transcripción del factor 1 y 2; GRE, Elemento de respuesta a glucocorticoides; SP1, Proteína estimulante de la transcripción 1. (Modificado de O'Connor *et al.*, 1995).

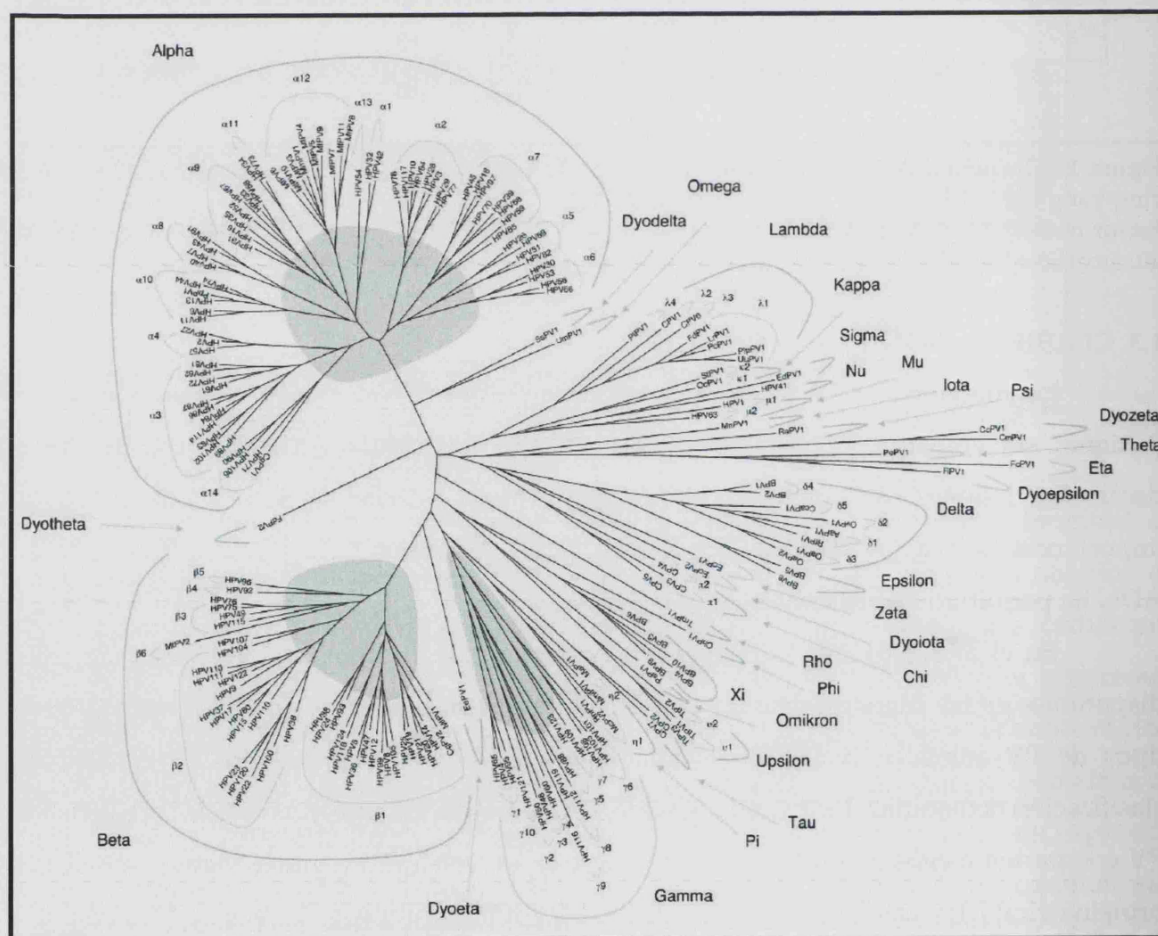
### 1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE VPH

La infección por VPH generalmente cursa sin síntomas o produce lesiones de carácter benigno, sin embargo, un pequeño porcentaje de individuos infectados puede llegar a desarrollar lesiones con potencial pre-maligno e incluso cáncer (Bosch, 2003). Debido a su importancia médica, los VPH han sido ampliamente estudiados y el análisis de su secuencia de ADN ha permitido identificar 120 tipos distintos.

En el año 2004, De Villiers *et al.* analizaron por primera vez las secuencias de PV disponibles en las bases de datos, y con secuencias representativas de 96 tipos de VPH y 22 tipos de PV animales, realizaron el análisis filogenético y establecieron los niveles de la clasificación taxonómica incluyendo: género, especie, tipo, subtipo y variantes. Los géneros de PV comparten menos de un 60% de homología de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína viral L1; y en el caso de la secuencia del genoma completo, los géneros tienen más del 23% pero menos del 43% de homología. Empleando como referencia la secuencia de nucleótidos de la proteína viral L1, las especies comparten entre el 60-70% de homología de la secuencia; los tipos el 71-89% de homología; los subtipos entre un 90-98%; y las variantes de



PV muestran divergencias de entre 1-2% en la secuencia nucleotídica. La investigación continuada ha permitido actualizar la nomenclatura inicial como resultado de la identificación de 28 tipos nuevos de VPH y 45 de PV animales (Bernard *et al.*, 2010), y hoy se definen 29 géneros de PV, que incluyen 66 especies, y que se distribuyen en: Alfa (14 especies), Beta (seis especies), Gamma (diez especies), Delta (cinco especies), Epsilon (una especie), Zeta (una especie), Eta (una especie), Theta (una especie), Iota (una especie), Kappa (dos especies), Lambda (dos especies), Mu (dos especies), Nu (una especie), Xi (una especie), Omikron (una especie), Pi (una especie), Rho (una especie), Sigma (una especie), Tau (una especie), Upsilon (dos especies), Phi (una especie), Chi (dos especies), Psi (una especie), Omega (una especie), Dyodelta (una especie), Dyoeplión (una especie), Dyozeta (una especie), Dyoeta (una especie), Dyotheta (una especie) y Dyoiota (una especie) (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Árbol filogenético de los 29 géneros de PV. Basado el alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de la región del genoma que codifica para la proteína viral L1 de los 189 tipos identificados. Los números al final de cada rama identifican tipo; especie y género, respectivamente. (Tomado de Bernard *et al.*, 2010).

De este total, sólo cinco géneros incluyen tipos que infectan humanos (Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu), y aproximadamente el 90% de los tipos caracterizados están incluidos en los géneros Alfa y Beta. En el caso de los subtipos, se detectan más frecuentemente en el género Beta, donde se han identificado 30 subtipos o posibles subtipos frente a los 10 subtipos o posibles subtipos del género Gamma o siete subtipos de Alfa (Hazard *et al.*, 2007); y en las variantes genómicas pueden aislarse entre 10-100 dependiendo de los tipos. El género Alfa incluye el mayor número de tipos e infectan tanto el epitelio cutáneo, causando verrugas comunes, como el epitelio mucoso del tracto anogenital. En este último grupo se conocen más de 30 tipos, y sólo un número reducido de ellos causan lesiones que pueden progresar a cáncer (Bosch *et al.*, 1995; Walboomers *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 2006). Los estudios de la asociación de estos tipos de VPH con el cáncer cervical, han permitido hacer una clasificación epidemiológica basada en la frecuencia con la que son localizados en las lesiones neoplásicas y que de acuerdo a su potencial oncogénico los divide en cuatro categorías: riesgo indeterminado, bajo, probablemente alto y alto (Muñoz *et al.*, 2006) (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Clasificación filogenética y epidemiológica de los tipos de PV que infectan el epitelio cutáneo y anogenital humano incluidos en el género Alfa (Modificado de Muñoz *et al.*, 2006).

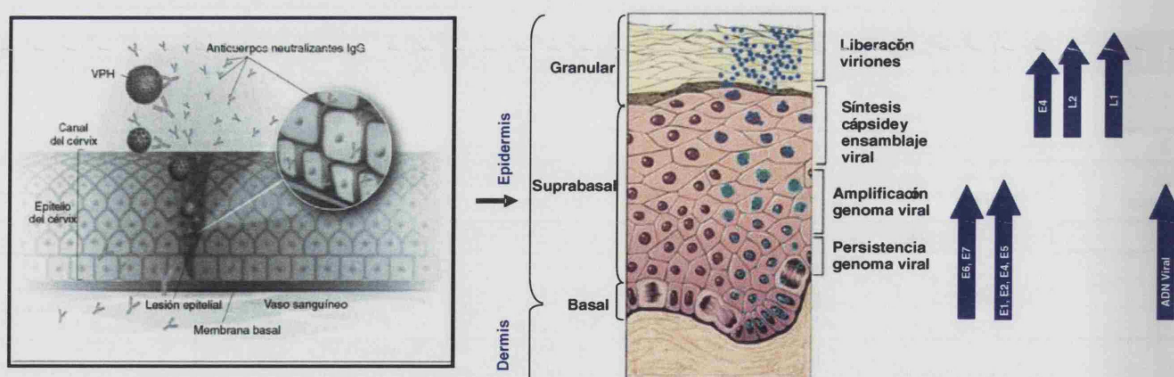
Especie	Tropismo	Riesgo oncogénico	Genotipo
1	Mucosa oral	Indeterminado	VPH32
	Mucosa genital	Bajo	VPH42
2	Epitelio cutáneo	Indeterminado	VPH3, VPH10, VPH17, VPH28, VPH29, VPH78, VPH94
3	Mucosa genital	Indeterminado	VPH62, VPH83, VPH84, VPH86, VPH87, VPH102
		Bajo	VPH61, VPH72, VPH81, VPH89
4	Epitelio cutáneo	Indeterminado	VPH2, VPH27, VPH57
		Indeterminado	VPH69
5	Mucosa genital	Probable alto	VPH26, VPH82
		Alto	VPH51
6	Mucosa genital	Indeterminado	VPH30
		Probable alto	VPH53, VPH 66
		Alto	VPH56
7	Mucosa genital	Indeterminado	VPH85, VPH97
		Bajo	VPH70
		Probable alto	VPH68
		Alto	VPH18*, VPH39, VPH45, VPH59
8	Epitelio cutáneo	Indeterminado	VPH7, VPH91
		Bajo	VPH40, VPH43
9	Mucosa genital	Indeterminado	VPH67
		Alto	VPH16*, VPH31*, VPH33*, VPH35, VPH52*, VPH58
10	Mucosa genital	Indeterminado	VPH55, VPH74
		Bajo	VPH6, VPH11, VPH13, VPH44,
11	Mucosa genital	Indeterminado	VPH34, VPH73
13	Mucosa genital	Bajo	VPH54
14	Mucosa genital	Indeterminado	VPH71, VPH90, VPH106

(\*) genotipos de VPH cuyas variantes se han analizado en este trabajo.

Entre los doce tipos incluidos en la categoría de alto riesgo (AR), VPH16 es el tipo más prevalente en la población general, responsable de aproximadamente el 50% de todos los cánceres anogenitales (Doorbar, 2006). Los tipos de bajo riesgo (BR) se asocian muy raramente con cáncer cervical, sin embargo son los causantes de las verrugas genitales, con una importancia médica notable por su elevada frecuencia. El género Beta está subdividido en cinco especies, e incluye tipos que causan lesiones subclínicas o infecciones latentes en población general, pero pueden llegar a tener importancia clínica en individuos inmunodeprimidos o en pacientes que padecen *Epidermodiaplasia verruciformis*, lo que les hace susceptibles a la infección (Harwood *et al.*, 2002; Pfister *et al.*, 2003). Los tipos incluidos en los géneros Gamma, Mu y Nu causan papilomas y verrugas cutáneas que no suelen progresar a cáncer, aunque hay descritas algunas excepciones (Pfister, 1992; Shamanin *et al.*, 1994).

#### 1.4. CICLO VIRAL DE VPH

En la **figura 1.4** se esquematizan las principales etapas del ciclo vital de VPH, desde la entrada de las partículas virales en zonas de descamación del epitelio hasta la liberación de las nuevas partículas virales.



**Figura 1.4. Esquema de la infección por VPH en el tejido epitelial mucoso.** En la figura se indican las capas del tejido y se esquematizan los acontecimientos más significativos que ocurren durante la infección por VPH. Los círculos rojos representan los núcleos de las células no infectadas; los círculos azules representan los núcleos de las células infectadas. La replicación del genoma viral se produce en las capas basal y suprabasal, así como la expresión de las proteínas virales E1, E2, E4, E5, E6 y E7. En la parte superior de la capa suprabasal se produce la síntesis de las proteínas estructurales L1 y L2, favoreciendo la proteína L2 el empaquetamiento del genoma viral y la proteína L1 el ensamblaje de los viriones. La liberación de los mismos se lleva mediante la descamación de las células que los contienen, en la capa granular del epitelio. (Modificado de Doorbar, 2006).

#### 1.4.1. Unión al receptor celular y entrada viral

La primera etapa de la infección es la unión del virión a las células basales del epitelio. El heparán sulfato, glicosaminoglicano de la matriz extracelular, es considerada una de las moléculas responsables de facilitar la adhesión inicial, al unirse a la región carboxi-terminal de la proteína viral L1 (Joyce *et al.*, 1999; Shafti-Keramat *et al.*, 2003; Patterson *et al.*, 2005). Como en el caso de otros virus, parece que es necesaria la unión a receptores celulares secundarios para una infección eficiente, aunque no se dispone de datos suficientes de este proceso. En el caso de VPH6 se ha descrito la integrina- $\alpha_6$  como un posible receptor, aunque para otros tipos no parece necesario (Evander *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 1999).

La entrada al interior celular es un proceso lento y los mecanismos implicados en las etapas de penetración y pérdida de la cápsida del virión parece que son similares a los que llevan a cabo los poliomavirus. En algunos tipos, se ha descrito que la penetración y el transporte al interior del núcleo podrían seguir las vías endocíticas mediadas por clatrina (VPH16) o caveolina (VPH31), empleando la red citoesquelética celular (Day *et al.*, 2003; Bousarghin *et al.*, 2003). Lisosomas y endosomas participan en la descapsidación viral y el ADN viral desnudo llega al núcleo, pero la vía de entrada al interior es un proceso que hasta el momento no es demasiado conocido, aunque se sabe que está mediado por secuencias específicas y por la proteína menor de la cápsida L2 (Howley, 1996; Joyce *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2002; Burd, 2003; Longworth *et al.*, 2004b; Doorbar, 2006).

#### 1.4.2. Replicación y transcripción viral

En las células de la capa basal, la entrada del genoma viral al núcleo celular inicia un período de replicación continuo pero moderado, que da lugar a la producción de 50-100 genomas virales extracromosómicos por célula. Esta concentración de episomas virales se mantiene en las células no diferenciadas, estableciendo una replicación vegetativa. Los genomas se replican a una media de una vez por célula durante la fase S del ciclo celular, en concordancia con el cromosoma celular, de manera que el genoma del virus es fielmente repartido entre las células hijas (Gilbert *et al.*, 1987; Longworth *et al.*, 2004a). El mecanismo que dirige esta replicación vegetativa y los procesos que la regulan son aún desconocidos, pero aseguran una infección latente y persistente en las células basales del epitelio. En las células diferenciadas de las capas superiores, tiene lugar la etapa final y se produce la replicación productiva de miles de genomas virales por célula para el ensamblaje en partículas virales (Flores *et al.*, 1997). Las proteínas virales implicadas en el proceso de replicación son E1 y E2. Ambas proteínas se unen y forman un complejo que favorece el reclutamiento de los



complejos de replicación celulares (la proteína de replicación A y la subunidad  $\alpha$ -primasa de la ADN polimerasa celular) para la replicación viral (Masterson *et al.*, 1998; Conger *et al.*, 1999; Han *et al.*, 1999; Loo *et al.*, 2004). La proteína viral E1 es una helicasa que abre el ADN a costa de la hidrólisis de ATP, rompiendo los puentes de hidrógeno y actuando como un hexámero (tres dímeros) en el origen de replicación viral. Presenta un orificio central por el que se cree que pasa el ADN, lo que permite la separación de la doble banda del ADN viral por delante del complejo de replicación (Hughes *et al.*, 1993; Longworth *et al.*, 2004a). La proteína viral E2 es la responsable del reconocimiento y de la unión de la proteína viral E1 al origen de replicación viral (Cripe *et al.*, 1987; Doorbar, 2006). Funciona como un dímero y se une a secuencias consenso del ADN [AACCg(N<sub>4</sub>)cGGTT] llamadas secuencias de unión de E2 (E2BS, *E2 Binding Sequences*), tres de las cuales flanquean este origen de replicación (Longworth *et al.*, 2004a; Dell *et al.*, 2003). Además de la función descrita, la proteína viral E2 parece que tiene un papel crítico en el anclaje de los genomas virales a los cromosomas mitóticos para una correcta segregación; en el caso concreto de los tipos de VPH-AR, la asociación parece que se hace empleando el huso mitótico y una serie de proteínas celulares adicionales (You *et al.*, 2004; McPhillips *et al.*, 2005). Otra importante función de la proteína viral E2 es actuar como un factor de transcripción, al regular el promotor viral temprano para controlar la expresión de los oncogenes virales (*e6* y *e7*). Juega un papel central en la regulación genética de los VPH al reprimir o activar la transcripción viral dependiendo de la cercanía entre sus sitios de interacción y la caja TATA (Álvarez-Salas *et al.*, 1995; Hines *et al.*, 1998). En los VPH que infectan el epitelio mucoso genital, existen dos E2BS a 3-4 pb de la caja TATA, de forma que cuando las concentraciones de la proteína E2 son bajas, ésta se une a sus secuencias, pero también lo hacen los factores celulares necesarios para la replicación y se activa el promotor temprano. Cuando las concentraciones de la proteína viral E2 son altas, se reprime la transcripción de las proteínas virales tempranas debido, posiblemente, a la exclusión física de los factores asociados a la caja TATA, y esta configuración da lugar a la represión del promotor temprano. (Romanczuk *et al.*, 1990; Steger *et al.*, 1997; Longworth *et al.*, 2004a).

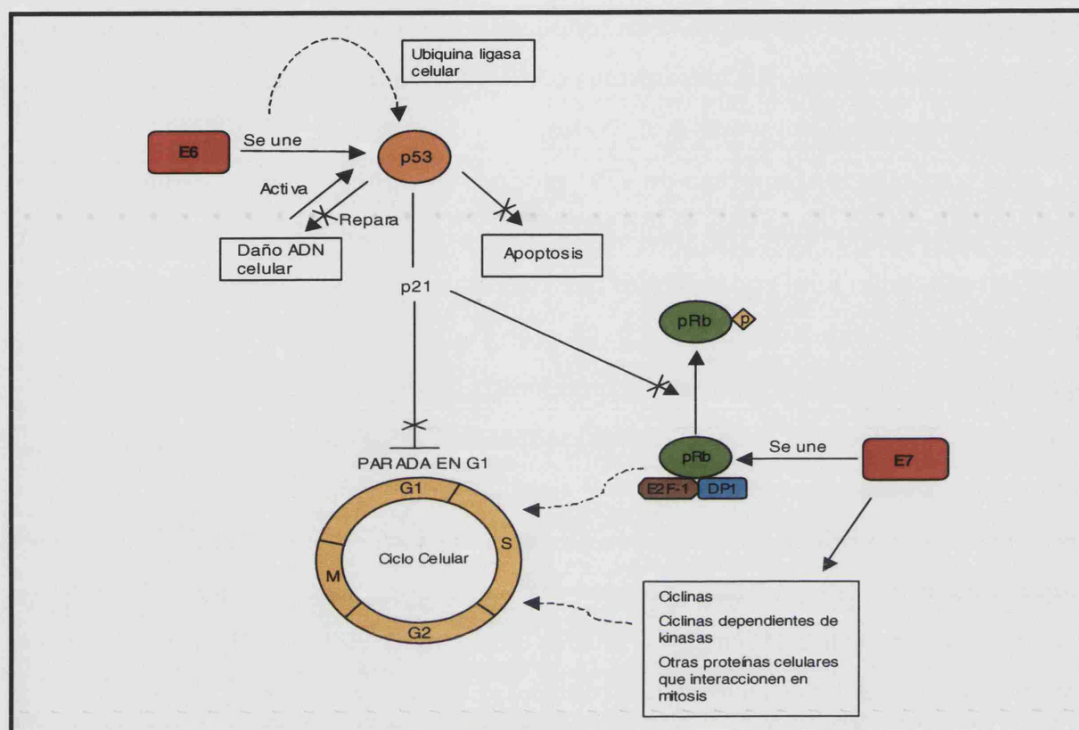
La transcripción viral tiene lugar en el núcleo celular y está regulada por el estado de diferenciación celular, por factores celulares específicos del propio tejido epitelial y por las proteínas virales. Los promotores de los distintos tipos de PV varían en su número y posición entre las distintas especies; así, en el virus del papiloma bovino se han determinado hasta siete promotores distintos, mientras que en los papilomas humanos han sido identificados seis. Las variaciones de algunos pares de bases observadas en la localización de los sitios de los promotores entre las distintas especies, no parece que influyan demasiado en la función y la

regulación (Velázquez *et al.*, 2002). Los mayoría de los ARN mensajeros (ARNm) generados a partir de los promotores conocidos en VPH son policistrónicos (tres o más marcos de lectura abiertos), y están sujetos a una serie de modificaciones post-transcripcionales, entre ellas procesamiento alternativo y poliadenilaciones en lugares concretos, lo que da lugar a la producción diferencial de los ARNm que codifican para las distintas proteínas virales individuales. Sin embargo, los mecanismos concretos que dirigen estas modificaciones no son demasiado conocidos (Longworth *et al.*, 2004a).

La transcripción temprana de VPH produce en primer lugar las proteínas virales E6 y E7, que actúan alterando las vías reguladoras del ciclo celular y modificando el entorno para facilitar la replicación viral en las células que han completado su diferenciación y permanecen en fase G0 del ciclo celular (Burd, 2003). La proteína viral E6 se distribuye por el núcleo y el citoplasma pudiendo unirse hasta a 12 proteínas celulares diferentes (Mantovani *et al.*, 2001; zur Hausen, 2002; An *et al.*, 2008; Tungteakkhun *et al.*, 2008; Howie *et al.*, 2009; Vos *et al.*, 2009). En la mayoría de los casos se desconoce el significado biológico, en concreto, no está claro si estos complejos de proteínas virales/celulares están únicamente implicados en el ciclo viral o si también contribuyen a la transformación maligna de la célula infectada. Sin embargo, una de las dianas de la proteína E6 más estudiadas es la proteína celular p53, que actúa regulando los puntos de control del ciclo celular G1/S y G2/M y con ello la expresión de ciertas proteínas implicadas en el control del ciclo celular, incluyendo el inhibidor de ciclinas dependientes de quinasas p21 (Ko *et al.*, 1996). Cuando el ADN celular es dañado, se activa p53, lo que induce altos niveles de expresión del inhibidor p21 y produce una parada en el ciclo celular, deteniendo el crecimiento y la división de las células que han sufrido el daño en su ADN. Si no se puede reparar el daño, la proteína p53 con el tiempo iniciará la muerte celular programada o apoptosis, impidiendo el crecimiento descontrolado de las células genéticamente dañadas (Huibregtse *et al.*, 1991; Hubbert *et al.*, 1992). Para los VPH-AR, la proteína viral E6 se asocia con la proteína celular p53 mediante una ubiquitina ligasa de la célula llamada proteína asociada a E6 (E6AP, *E6 Associated Protein*) formando un complejo ternario que da lugar a la ubiquitinización de p53, y a su consecuente degradación por el proteosoma 26S (complejo multiprotéico), reduciendo la vida media de p53 de unas horas a minutos (Huibregtse *et al.*, 1991; Huibregtse *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 2004). La disminución de la actividad de p53 provocada por la unión de E6, da lugar a la pérdida de esta regulación del ciclo celular, provocando la duplicación de los cromosomas y anomalías en el centrosoma, lo que incrementa enormemente la probabilidad de las células de evolucionar a un fenotipo maligno (**Figura 1.5**) (Kesis *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1997). Para los



VPH-BR la afinidad de unión de la proteína E6 con p53 es menor, lo que limita su capacidad para unirse a E6AP, y además no se observa la degradación de p53 (Lechner *et al.*, 1994; Hiller *et al.*, 2006).



**Figura 1.5. Esquema de las funciones asociadas a las proteínas virales E6 y E7.** Las proteínas virales E6 y E7 se unen en primer lugar a las proteínas celulares p53 y la proteína del retinoblastoma (pRB), respectivamente. La proteína E6 de los VPH-AR es capaz de interferir en la regulación negativa de la función de p53, uniéndose a ella y ubiquitinizándola, lo que lleva a la disminución en los niveles de p53. La degradación de pRB por parte de la proteína E7 de los VPH-AR, permite la activación de una replicación productiva en las células diferenciadas del epitelio. En ambos casos, la alteración de las vías regulatorias del ciclo celular da lugar a la transformación celular. (Modificado de Burd *et al.*, 2003).

De esta forma, la degradación de p53 mediada por VPH es clave en el proceso de carcinogénesis, de la misma manera a como ocurre en otros cánceres humanos en los se observa muy a menudo que el gen de p53 está mutado. Además de ésta se han descrito otras funciones de la proteína E6, como su capacidad de activar la transcripción de la subunidad catalítica de la telomerasa (Klingelutz *et al.*, 1996). La actividad de la telomerasa está restringida a las células embrionarias, de manera que en las células somáticas su síntesis está reprimida, lo que lleva al acortamiento de los telómeros con la edad, que parece relacionarse con la senescencia de las células y su muerte. Sin embargo, las células infectadas por VPH16 albergan una actividad de la telomerasa muy elevada, lo que da lugar al mantenimiento de la longitud de los telómeros y la proliferación de forma indefinida (Liu, 1999; Ghittoni *et al.*,

2010). Los estudios al respecto, han descrito diversos mecanismos implicados en esta activación transcripcional de la enzima inducida por VPH y que predisponen a una infección de larga duración y al desarrollo de cáncer (Veldman *et al.*, 2003; Gewin *et al.*, 2004; Bedard *et al.*, 2008; Sekaric *et al.*, 2008).

La proteína viral E7, localizada principalmente en el núcleo celular, se une a la proteína celular Rb, miembro de la familia de las proteínas supresoras de tumores del Rb junto con las proteínas p107 y p130. Los miembros de esta familia son los principales reguladores de la permanencia de las células en la fase G0 del ciclo celular, después de producirse la diferenciación celular (Berezutskaya *et al.*, 1997; Classon *et al.*, 2001). En concreto, la proteína Rb regula negativamente, a través de la asociación directa, la transcripción de diversos factores de transcripción entre los que se incluyen los miembros de la familia E2F (E2F1-8), que están asociados con las proteínas celulares DP (Cobrinik *et al.*, 2005; Dimova *et al.*, 2005). La unión de la proteína E7 a pRb, produce su bloqueo e impide su unión al complejo formado por el factor de transcripción celular E2F-1 y la proteína celular DP1, lo que da lugar a la activación constitutiva de ciertos genes cuyos productos son necesarios para la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular (**Figura 1.5**).

Todas las proteínas E7 de los tipos de VPH mucosos contienen el dominio de unión para pRb, pero la afinidad de unión por la misma puede diferir considerablemente, y la proteína E7 de los VPH-BR se une a pRb con menor afinidad que la proteína E7 sintetizada en los tipos de AR (Munger *et al.*, 1989). Además, se ha observado que la degradación de la proteína a través del mecanismo dependiente de la ubiquitinización por el proteosoma es una propiedad exclusiva de los tipos de VPH-AR, lo que da como resultado la estimulación de la síntesis y la proliferación en las células ya diferenciadas del epitelio (Boyer *et al.*, 1996; Berezutskaya *et al.*, 1997; Helt *et al.*, 2003). De la misma forma que ocurre con la proteína E6, la proteína E7 interacciona también con otras proteínas celulares citoplasmáticas y nucleares, en muchos casos estos mecanismos están todavía en estudio (Ghittoni *et al.*, 2010).

Además de las descritas, son sintetizadas las proteínas virales E4 y E5. La proteína E4 se describe como una proteína de expresión temprana al observarse ciertos niveles de expresión en las primeras fases de la infección en las células basales, sin embargo los mayores niveles se encuentran en células epiteliales diferenciadas, durante la fase tardía de la infección. La proteína se sintetiza como una proteína de fusión con los cuatro primeros aminoácidos de la proteína E1 (E1<sup>E4</sup>), y actúa formando complejos hexaméricos que se unen y alteran la red de queratina del citoplasma en la célula infectada, produciendo la desorganización de la estructura celular. Esto sugiere que podría facilitar la liberación de las partículas virales

maduras del interior de la célula. En VPH11 y VPH16, se ha observado además que su sobreexpresión produce una parada en fase G2 del ciclo celular y aunque no está claro que implicación tiene esta parada en el ciclo viral, parece contrarrestar los efectos de la proteína viral E7 que actúa estimulando las células a fase S (Doorbar *et al.*, 1991; Howley, 1996; Dhahi *et al.*, 2002). La proteína viral E5 es una pequeña proteína hidrofóbica que se localiza sobre todo en la membrana del retículo endoplasmático, pero también está asociada a H<sup>+</sup>-ATPasas vacuolares, para retrasar el proceso de acidificación de los endosomas. La función de esta proteína no está clara, aunque parece favorecer un ambiente para la estimulación de la replicación viral, mediado por su unión al receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*), dando lugar a una proliferación celular continuada y una pérdida de la diferenciación celular (Straight *et al.*, 1995; Rodriguez *et al.*, 2000; Disbrow *et al.*, 2005).

En las células totalmente diferenciadas se transcriben, a partir de los promotores tardíos, los genes que codifican para las proteínas de la cápsida viral, L1 y L2. Los procesos que unen la amplificación del genoma a la síntesis de las proteínas de la cápsida viral están todavía en estudio, aunque parece que dependen de cambios en el *splicing* de los ARNm y en la generación de transcritos que terminan en los sitios de poliadenilación tardíos. Durante la diferenciación celular epitelial, la síntesis de la cápsida está regulada, tanto a nivel de procesamiento del ARN como a nivel de síntesis de proteínas (Zhou *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2000). Por un lado, se controla la estabilidad del ARNm con elementos reguladores negativos, presentes tanto en las regiones codificantes como en la región reguladora, y por otro con la presencia de un silenciador de *splicing* en el gen *l1*, lo que lleva, al menos en el caso de VPH16, a la síntesis preferencial de los transcritos tempranos en las células que están proliferando (Zhao *et al.*, 2003).

#### 1.4.3. Ensamblaje y liberación de las partículas virales

Las partículas virales ensambladas en el núcleo son liberadas con la descamación de las células de la última capa de la epidermis. El ensamblaje de las partículas infecciosas en las capas superiores del epitelio requiere la presencia de la proteína viral E2, junto con las proteínas virales L1 y L2, para mejorar la eficacia del proceso de encapsidación (Day *et al.*, 1998). Los procesos que permiten la entrada de las proteínas de la cápsida al interior del núcleo para el ensamblaje de las mismas, junto con el ADN viral, están todavía en estudio, aunque parece que el transporte está mediado por receptores de la familia Kap (Middleton *et al.*, 2003).

## 1.5. PATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VPH ANOGENITAL

El primer PV animal fue descrito por Richard Shope (1930), que identificó y caracterizó la naturaleza transmisible de los papilomas en los conejos comunes. La introducción de las técnicas de biología molecular permitió el conocimiento de las funciones de los diferentes genes virales, fundamentalmente los oncogenes, además de las propiedades biológicas y bioquímicas del virus. El establecimiento de la relación causal entre la infección viral y el desarrollo de cáncer fue sugerido por primera vez a principios del año 1976 y en el año 1981, Zur Hausen *et al.* detectaron la presencia de ADN de VPH en neoplasias, siendo descrita la capacidad de las proteínas virales E6 y E7 de VPH16 para immortalizar y transformar queratinocitos humanos en el año 1989.

El VPH infecta el tejido epitelial del tracto anogenital, aunque también puede producir lesiones en el trato superior aerodigestivo (cavidad oral, faringe y laringe) y el tejido epitelial cutáneo. La infección anogenital se localiza fundamentalmente en una delgada región del epitelio conocida como zona de transición, localizada tanto en el cérvix como en el canal anal, y que limita el tejido epitelial columnar y el tejido epitelial escamoso.

### 1.5.1. Infección subclínica

La gran mayoría de las infecciones por VPH se incluyen en este grupo. Al no presentar una evidencia clínica o morfológica, la infección pasa desapercibida y se facilita el contagio. Sólo es posible detectarla con métodos de determinación del ADN viral.

### 1.5.2. Infección clínica

Una pequeña proporción de infecciones por VPH se manifiestan clínicamente, son en su mayoría de tipo benigno y en aproximadamente el 90% de los casos se produce un aclaramiento, ya que el sistema inmune es capaz de controlar la infección. Sin embargo, un pequeño porcentaje de individuos pueden llegar a desarrollar lesiones con potencial premaligno e incluso cáncer, generalmente a partir de infecciones crónicas o persistentes.

#### 1.5.2.1. Verrugas anogenitales

Las verrugas anogenitales o su acumulación (*condyloma acuminata*) son tumores benignos que se localizan en cualquier zona de los genitales externos e internos. Son la consecuencia de la proliferación anormal de las células y están causadas, en la mayor parte de los casos, por la infección con tipos de BR (VPH6, 11, 30, 42, 43, 54, 55, 70). En los individuos inmunocompetentes, más del 90% de las verrugas genitales están relacionadas con los tipos de VPH6 y 11, siendo el más observado VPH6 (55-90% de los casos). En el caso particular de los

individuos inmunodeprimidos, es mayor la prevalencia del tipo 11 con respecto al tipo 6, se observan más lesiones que contienen infecciones con tipos de AR, con más de un tipo, o incluso verrugas genitales en las que no se observa la presencia de los tipos 6 u 11.

#### 1.5.2.2. Lesiones precursoras de cáncer en cérvix y ano

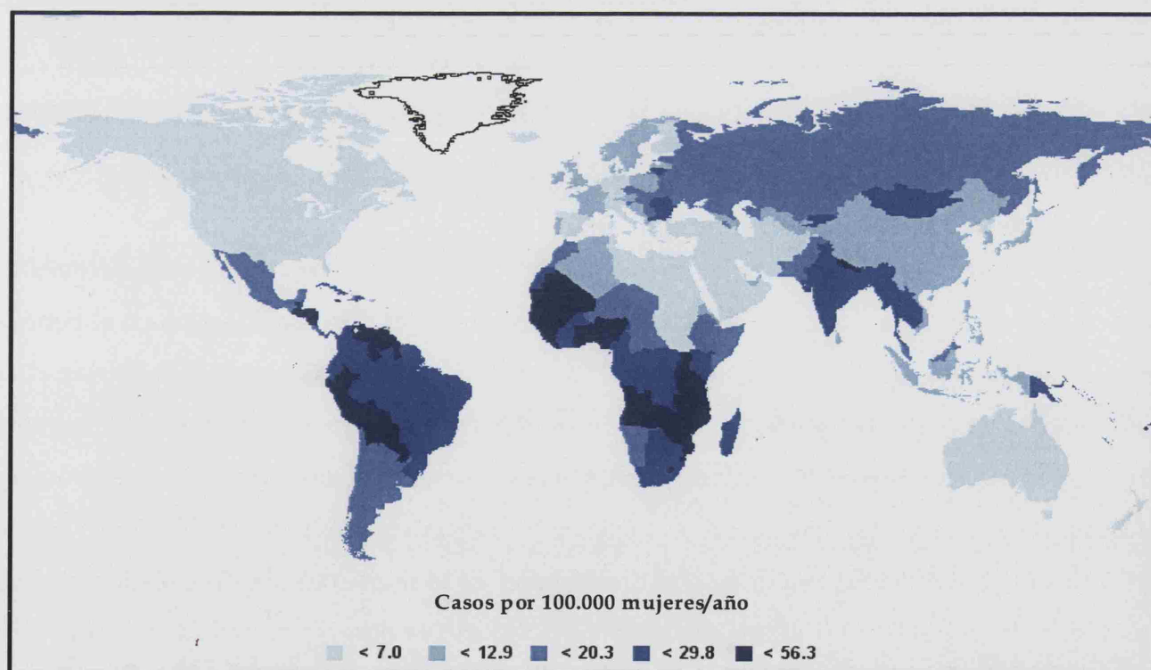
Los cambios histopatológicos resultado de la infección por VPH en cérvix han sido descritos y la terminología de las alteraciones del epitelio ha evolucionado paralelamente al avance del conocimiento de la biología e historia natural del virus. Inicialmente se describió el carcinoma *in situ* y fue en la década de los cincuenta cuando se estableció el término displasia para los cambios epiteliales menos acusados. La demostración de cambios histológicos que eran similares en algunas displasias y el carcinoma *in situ* condujo, a principios de los años 70, a la introducción del concepto de neoplasia cervical intraepitelial (CIN, *Cervical Intraepithelial Neoplasia*), que unificaba los conceptos anteriores y clasificaba las lesiones en tres grados de menor a mayor severidad (I, II y III). En la actualidad, sigue empleándose esta terminología en el diagnóstico histológico, pero no en el citológico. En el año 1989 se propuso el Sistema Bethesda para describir las alteraciones citológicas, incluyendo nuevos conceptos sobre infección cervical por VPH. En el año 2001 se revisó y modificó ligeramente dicha clasificación, sustituyendo el término neoplasia por lesión escamosa intraepitelial (SIL, *Squamous Intraepithelial Lesion*) con dos categorías: bajo grado (LSIL, *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion*) y alto grado (HSIL, *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*). Las lesiones de bajo grado reflejan cambios morfológicos debidos a la replicación activa de VPH, y no son considerados precancerosos. Sin embargo, HSIL incluye CIN II y CIN III, respectivamente, y estas lesiones, concretamente CIN III, son consideradas verdaderas lesiones precursoras de cáncer cervical. Al igual que en el cáncer cervical invasivo, el cáncer anal invasivo es precedido de lesiones precursoras claramente establecidas y que se denominan neoplasia anal intraepitelial (AIN, *Anal Intraepithelial Neoplasia*) (clasificación histológica) o LSIL/HSIL (clasificación citológica). El AIN I y el LSIL no se consideran precursores directos del cáncer anal invasivo, pero pueden predecir el desarrollo posterior de AIN II/III o HSIL.

#### 1.5.2.3. Cáncer de cérvix y cáncer de ano

En las grandes series de casos de cáncer cervical invasivo, el ADN de VPH ha sido identificado en el 99,7% de los tumores, por lo que se ha establecido que es la causa necesaria para su desarrollo (Bosch *et al.*, 1995; Walboomers *et al.*, 1999). En un estudio mundial de 3.000 casos publicado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) (Muñoz *et al.*, 2004a) y en un meta análisis de aproximadamente 10.000 casos (Clifford *et al.*, 2003), se han descrito las distribuciones de tipos de VPH en el



cáncer cervical, y los ocho tipos más comunes en las muestras analizadas en ambas series fueron: VPH16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35. De acuerdo con su clasificación histológica, el 85% de los cánceres cervicales pertenecen al tipo escamoso, le siguen adenocarcinomas, y un pequeño número son tumores neuroendocrinos. Los estudios llevados a cabo en base a su clasificación histológica, muestran que VPH16 y 18 son los más comunes para los tipos escamoso y adenocarcinoma, pero la fracción de cánceres escamosos atribuibles a VPH16 y VPH18 es del 70%, mientras que para el adenocarcinoma es del 86%. (Muñoz *et al.*, 2004a; Castellsagué *et al.*, 2006). Los datos publicados para cáncer de cérvix por Globocan en el año 2008, lo sitúan como el segundo cáncer más común en el mundo, describiéndose aproximadamente 530.000 casos/año (**Figura 1.6**), con una mortalidad anual de cerca de la mitad de los casos (Ferlay *et al.*, 2010). A pesar de que el cáncer cervical se describe en todo el mundo, su frecuencia está distribuida de manera desigual, siendo en los países en vías de desarrollo donde se describen la mayor parte de los casos (80%), lo que se atribuye a las diferencias para acceder a las estrategias de prevención tales como el cribado mediante la citología o el tratamiento de las lesiones precursoras de cáncer (Hoory *et al.*, 2008).



**Figura 1.6.** Tasas de incidencia estandarizadas por edad del cáncer de cérvix actualizadas en 2008 en el mundo. (Ferlay *et al.*, 2010).

En relación a la asociación de la infección por VPH y el cáncer anal, en una revisión de 35 estudios realizada en pacientes con cáncer anal invasivo y publicada por Hoots *et al.* en el

año 2009, se describió la presencia de VPH en el 86,5% de las mujeres y 76,7% de los hombres. El tipo de VPH más prevalente fue VPH16, que se identificó en el 73,7% de los casos en las mujeres y en el 60% de los hombres, seguido de VPH18, aunque éste sólo se identificó en, aproximadamente, el 8% de los casos, tanto en mujeres como en hombres. La presencia descrita de otros tipos de VPH fue menor. La mayor parte de los cánceres anales invasivos pertenecían al tipo histológico escamoso (74,5%), aunque una pequeña proporción de los cánceres eran clasificados como basaloides (3,4%), adenocarcinomas (0,7%) o no tenían asignada una clasificación histológica (21,4%), de manera que para el análisis de los datos se emplearon los dos tipos histológicos más frecuentes. Los datos de cáncer anal publicados en el año 2002, describen aproximadamente 99.000 nuevos casos en el mundo, el 60% en mujeres y el 40% en hombres, pero a pesar de la baja frecuencia de este cáncer, en los últimos 50 años se ha descrito un incremento de la tendencia en su incidencia tanto en mujeres como en hombres (Giuliano *et al.*, 2008). Durante el período 1973 a 2000, la incidencia de cáncer anal en los Estados Unidos se incrementó dos veces más entre los hombres que entre las mujeres (Daling *et al.*, 2004), y esta incidencia es particularmente mayor (10-50 veces) entre los hombres que practican sexo con hombres (HSH) y los adultos (hombres y mujeres) infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), cuando es comparada con la población general (Rabkin *et al.*, 1994; Melbye *et al.*, 1994a; Koblin *et al.*, 1996; Goedert *et al.*, 1998; Grulich *et al.*, 1999; Frisch *et al.*, 2000, 2001; Mbulaiteye *et al.*, 2003; Dal Maso *et al.*, 2003; Parkin *et al.*, 2006a; Hessol *et al.*, 2007).

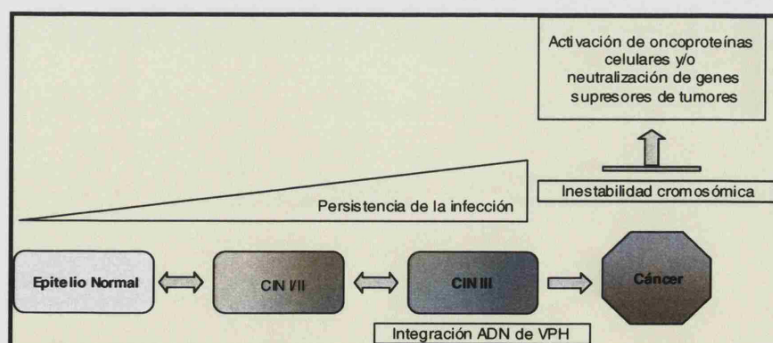
#### **1.5.2.4. Otros cánceres anogenitales**

Además del cérvix y el ano, la infección por VPH se detecta en otras localizaciones del tracto anogenital que presentan epitelio estratificado como son la vulva, la vagina o el pene. El cáncer de vulva y vagina en los datos publicados por Globocan en el año 2002 (Ferlay *et al.*, 2004) representan aproximadamente un 3% y un 2% respectivamente, de los cánceres en el mundo (Sankaranarayanan *et al.*, 2006), y en ambos casos con más frecuencia en mujeres mayores; el 66% de las pacientes con diagnóstico de cáncer de vulva tienen 70 años o edades superiores y en el cáncer de vagina la media de edad en el momento del diagnóstico es de 69 años (Giuliano *et al.*, 2008). La prevalencia de ADN de VPH observada en el cáncer de vulva varía desde 27,3% al 100% y VPH16 es el tipo que se detecta con más frecuencia, seguido de VPH18 (Giuliano *et al.*, 2008). En el cáncer de vagina, el ADN de VPH se detecta en el 91% de los casos y, de la misma manera que en el cáncer de vulva, VPH16 es el tipo más prevalente (Hildesheim *et al.*, 1997; Carter *et al.*, 2001; Daling *et al.*, 2002). El cáncer de pene representa menos de un 0,5% de los cánceres en los hombres y la correlación geográfica entre las

incidencias de los cánceres de pene y cervical en parejas, lleva a pensar en un origen común para ambos (Micali *et al.*, 2006). El ADN de VPH es detectado en el 40-50% de todos los cánceres de pene, y los estudios serológicos han confirmado el papel de VPH16 y 18 (IARC, 2007). En una revisión bibliográfica de los principales estudios (1986-2008) publicada por Miralles-Guri en el año 2009, se confirman estos datos de prevalencia global de infección por VPH (46,9%) e indican que la mitad de los tumores de pene están asociados a los tipos 16 y 18.

### 1.5.3. Progresión a cáncer de la infección viral

Debido a que la relación entre VPH y cáncer cervical es la más estudiada, nos centramos en ésta para describir las principales etapas de la carcinogénesis que incluyen: la infección en la zona de transición del epitelio por uno o más tipos de VPH-AR, la persistencia del virus, la progresión de las lesiones precursoras de cáncer y la invasión del tejido (**Figura 1.7**). Las razones por las que la infección por VPH tiende a causar cáncer en las áreas que se conocen como zonas de transición son desconocidas, pero el cérvix y el ano son ejemplos de tejidos con zonas de transformación propensos a la carcinogénesis viral (Moscicki *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos la infección por VPH es transitoria porque el sistema inmunológico es capaz de resolverla y, como hemos indicado, puede o no estar asociada a la aparición de lesiones clínicas. El tiempo de aclaramiento de la infección para los tipos de AR, particularmente VPH16, es de media 8-14 meses, considerablemente más alto que para los tipos de bajo riesgo, que suele ser de 5-6 meses (Franco *et al.*, 1999; Giuliano *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2005). Sin embargo, si la respuesta inmune no es eficiente, la infección por VPH se puede establecer como persistente, lo que es probable que lleve a que se produzcan cambios genéticos secundarios, dada la capacidad de las proteínas virales para interferir con los puntos de control del ciclo celular, e inducir la inmortalización del queratinocito.



**Figura 1.7. Esquema del proceso de transformación inducido por VPH.** (Modificado de Ghittoni *et al.*, 2010).



Los factores que están asociados a esta persistencia viral son difíciles de interpretar, ya que no se conoce en que paso de los múltiples que incluye el proceso carcinogénico, están más involucrados o a que nivel. Sin embargo, se han descrito a nivel viral además del tipo de VPH, la elevada carga viral, la presencia de más de un tipo en el epitelio y la presencia de ciertas variantes de VPH (Xi *et al.*, 1995; Xi *et al.*, 1997), tema principal de este trabajo. Otros cofactores de persistencia que podrían modular la historia natural de la infección por VPH son el consumo de tabaco, el uso prolongado de anticonceptivos orales, el empleo de métodos profilácticos, un elevado número de alumbramientos, la presencia de otras infecciones de transmisión sexual (*Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*), el consumo de alcohol, o el efecto protector de la ingesta de diferentes nutrientes (vitaminas E-C,  $\beta$ -caroteno, licopeno) frutas y verduras (Moscicki *et al.*, 2006). De especial interés en este trabajo es la inmunodepresión causada como consecuencia de la infección por VIH-1, descrita también como un factor de riesgo para la persistencia viral así como otros estados de inmunodepresión (Sun *et al.*, 1997; Frisch *et al.*, 2000; Palefsky *et al.*, 2003). A pesar de lo descrito, la persistencia no es suficiente para el desarrollo de cáncer ya que existen tipos que no están identificados como carcinogénicos, que también persisten (ej. VPH61).

La progresión de las lesiones y la invasión del tejido se sabe que también son necesarios, sin embargo, tampoco es posible determinar el momento exacto de transición desde que VPH infecta el epitelio hasta el estadio previo a cáncer, definido como CIN III, debido a la dificultad que implica la clasificación histológica de una lesión intraepitelial cervical de grado II.

En el cáncer de cérvix, en una elevada proporción de las células, se detecta el ADN de VPH integrado en el genoma celular del hospedador. Esta integración viral, que se produce mediante recombinación no homóloga, ocurre preferentemente en los sitios frágiles de los cromosomas. La integración implica la pérdida del gen *e2*, y como consecuencia se produce una regulación positiva de la expresión de las proteínas virales E6 y E7, lo que facilita la transformación celular (Ghittoni *et al.*, 2010).

## 1.6. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VPH ANOGENITAL

La infección por VPH es la más común de las infecciones de transmisión sexual (ITS) que se diagnostican actualmente en la población mundial. Se han descrito formas alternativas de transmisión, que incluyen la transmisión vertical o materno-infantil y horizontal o por fomites, pero el impacto potencial en el número de infecciones o en su patología asociada es mucho menor. El factor más documentado para la adquisición de la infección por VPH es el

número de parejas sexuales; a mayor número de parejas sexuales mayor será el riesgo de adquirir la infección (Muñoz *et al.*, 2004b; Moscicki *et al.*, 2006). Otros posibles factores de riesgo son el inicio temprano de las relaciones sexuales (Burchell *et al.*, 2006), el consumo de tabaco (Burchell *et al.*, 2006) y la ausencia del uso del preservativo (Winer *et al.*, 2006). El uso de anticonceptivos orales, un alto número de alumbramientos, y la infección previa con otras infecciones de transmisión sexual no se han asociado claramente con el riesgo de adquirir la infección (Moscicki *et al.*, 2006). En algunos estudios, se ha apuntado la circuncisión masculina como una medida de protección frente a la infección por VPH para reducir el riesgo de cáncer cervical, aunque es un factor todavía en estudio (Castellsague *et al.*, 2002). En el caso particular del grupo de HSH, población de estudio en este trabajo, los factores de riesgo para la presencia de la infección anal por VPH incluyen, además de los descritos, la infección por VIH, bajos niveles de CD4, la presencia de verrugas genitales y una historia de relaciones sexuales anales receptivas (Critchlow *et al.*, 1998).

#### 1.6.1. Prevalencia de la infección en mujeres

Los estudios de la infección por VPH mediante técnicas de detección de ADN en mujeres asintomáticas en población general, estiman una prevalencia de la infección con datos variables (Trottier *et al.*, 2006). Esta amplia variación en los datos bibliográficos son explicados en gran parte por las diferencias en la edad de la población estudiada, y en la sensibilidad de la metodología molecular empleada para detectar el genoma viral (Bosch *et al.*, 2003). En cualquier caso, la prevalencia de la infección es mayor entre las mujeres jóvenes sexualmente activas (Schiffman *et al.*, 1992; Kjaer *et al.*, 2001). La mayoría de los estudios epidemiológicos describen la prevalencia de la infección con una tendencia a disminuir con la edad, lo que puede explicarse posiblemente por la combinación ciertos factores, entre ellos la disminución de la exposición a VPH, la naturaleza autolimitante de la propia infección y la resistencia a re-infecciones. Sin embargo, en estudios llevados a cabo en poblaciones de América del Sur, se describe una tendencia en U, con un incremento de la prevalencia en la madurez (Herrero *et al.*, 2000; Salmeron *et al.*, 2003). Esto podría reflejar cambios en el comportamiento sexual (efecto cohorte), lo que resulta en nuevas exposiciones en esta etapa vital o reactivaciones de infecciones latentes adquiridas en la etapa juvenil (Ferenczy *et al.*, 1985; Maran *et al.*, 1995; Boxman *et al.*, 1999).

Las estimaciones de prevalencia de infección en mujeres de población general en el mundo han sido coordinadas por la IARC, comparando estudios realizados con la misma metodología de diagnóstico molecular y análisis epidemiológico. En función de los datos

obtenidos, las tasas más altas de prevalencia se observan en Nigeria (28%) (Thomas *et al.*, 2004) o en países latinoamericanos como Argentina (17%) (Matos *et al.*, 2003) y Costa Rica (16%) (Herrero *et al.*, 2000). En los países europeos estudiados se describen prevalencias de infección más bajas, como es el caso de Suecia (7%) (Forslund *et al.*, 2002) o en España, donde el único estudio de ámbito poblacional fue llevado a cabo en la ciudad de Barcelona y la prevalencia de la infección descrita fue de un 3% (de Sanjose *et al.*, 2003). En España existen otros trabajos en los que se describen datos de prevalencia de la infección, aunque empleando muestreo de conveniencia. Es el caso de un estudio de 1.011 mujeres realizado en un centro de planificación familiar en Alicante, en el que se describe una prevalencia global de infección de VPH-AR del 10%, siendo del 8,2% en mujeres españolas, 27,5% en mujeres colombianas, de 23,1% en mujeres ecuatorianas y 22,7% en mujeres de otros países latinoamericanos (González *et al.*, 2006). Puig *et al.* observan una prevalencia muy similar (10,6%) para 298 mujeres que acuden a una red de centros urbanos de detección precoz de cáncer de cérvix en Zaragoza, en el año 2005.

Un grupo de gran interés en el estudio de la prevalencia de la infección por VPH en mujeres son las poblaciones de alto riesgo de infección, que incluyen mujeres que ejercen la prostitución y las internas en prisión. La elevada prevalencia de infección con respecto a la población general, puede estar asociada a múltiples factores de riesgo como la coinfección por VIH y otras ITS, y estar sometidas a exclusión social. Los datos en España en mujeres que ejercen la prostitución parten de trabajos publicados por grupos en diferentes ciudades. En el año 2001, se describe una prevalencia del 61,6% en una muestra de 177 mujeres que acuden a una clínica especializada en enfermedades transmisibles sexualmente de la ciudad de Oviedo (Touze *et al.*, 2001); y en el año 2002, en un centro de enfermedades de transmisión sexual en la ciudad de Madrid, la prevalencia obtenida para una muestra de 754 mujeres inmigrantes fue del 39% (Del Amo *et al.*, 2005). Los datos publicados en mujeres en prisión en España son escasos. En un trabajo llevado a cabo en Barcelona, se describió una prevalencia del 46%; y entre los factores de riesgo que se identificaron se encontraban estar infectada por VIH y haber consumido drogas durante más de 10 años (de Sanjose *et al.*, 2000). En la ciudad de Alicante, se observó una prevalencia de la infección del 29% (Gonzalez *et al.*, 2008). En esta línea, los datos de prevalencia obtenidos en un estudio de 1.889 mujeres (Madrid y Alicante), que incluía mujeres de población general y de alto riesgo (mujeres que ejercen la prostitución y reclusas en prisión), fueron 10,7% y 31,5%, respectivamente (Ortiz *et al.*, 2006).

### 1.6.2. Prevalencia de la infección en hombres

Existen numerosos trabajos publicados sobre la infección por VPH y sus consecuencias en las mujeres, sin embargo los datos en hombres son más escasos. A finales de los años 90 se empieza a vislumbrar que el VPH produce en la zona de transición del canal anal lesiones similares a las que produce en el cérvix uterino, y que éstas son más frecuentes en HSH que en hombres heterosexuales. La mayoría de estudios publicados en los últimos años son principalmente los realizados en HSH y coinfectados por VIH, dada la alta prevalencia de infección y lesión anal en esta población. Los datos bibliográficos sobre la infección por VPH en hombres heterosexuales son escasos. En el año 2006, Dunne *et al.*, realiza una revisión de diversos estudios disponibles en la literatura sobre infección por VPH en hombres asintomáticos. La prevalencia de infección varió en base a la toma de muestra, la localización anatómica de la misma (prepucio, glande, escroto, uretra o el cuerpo del pene) y la metodología de diagnóstico molecular empleada. La prevalencia en el glande fue 6,5%-50%; en el cuerpo del pene 5,6%-51,5%; en el prepucio 24%-50%; en el escroto 7,1%-46,2% y en la uretra los datos de prevalencia oscilaron entre 8,7%-50%. Algunos estudios evaluaron la región perianal, el ano o el recto encontrándose valores de prevalencia de VPH que oscilaron entre el 0% y el 32,8%. Como conclusión a dicho trabajo, destacar que las mejores localizaciones para realizar la toma de muestra fueron el glande, el prepucio, el cuerpo del pene y el escroto. Si bien el semen y la orina se han utilizado en diversos estudios publicados en la bibliografía para el análisis de prevalencia de infección por VPH, estas muestras biológicas no se consideran las más apropiadas (Giuliano *et al.*, 2007; Nielson *et al.*, 2007).

### 1.6.3. Prevalencia de la infección en mujeres y hombres infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana

Históricamente, los principales estudios de neoplasias asociadas a VPH en estados de inmunodepresión se realizaron en pacientes receptores de un transplante (Roka *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2005), pero en los últimos años la mayoría de los estudios de prevalencia de infección o de lesiones asociadas se han focalizado en los pacientes infectados por VIH. Tanto VPH como VIH son ITS, de tal forma que las personas que han adquirido el VIH por vía sexual, tienen una alta probabilidad de ser infectados por VPH ya que los factores que incrementan la susceptibilidad de los pacientes VIH positivos para la infección por VPH, facilitan que ésta sea más persistente y/o altera la historia natural de infecciones preexistentes de VPH (Fife *et al.*, 2009). Al igual que ocurre en las mujeres y hombres no infectados por VIH, los estudios de la prevalencia de infección por VPH en mujeres coinfectadas por VIH,

presentan diferencias en el diseño y en la metodología empleadas para la detección del ADN de VPH. Las publicaciones más recientes en mujeres infectadas por VIH describen altas tasas de prevalencia de infección anogenital, que varían entre 44-84%. (Anderson *et al.*, 2008; Hessol *et al.*, 2009; Dames *et al.*, 2009; Fife *et al.*, 2009). De la misma manera, los hombres heterosexuales infectados por VIH han mostrado valores elevados de infección anal por VPH, que varían entre 23,8% y 64% (Abramowitz *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2009). La mayor parte de los estudios de prevalencia de infección anal en hombres infectados por VIH-1 se han llevado a cabo en HSH, y en todos se describen tasas de infección anal muy elevadas (85-97,9%) (Critchlow *et al.*, 1998; Piketty *et al.*, 2003; Palefsky *et al.*, 2005; De Pokomandy *et al.*, 2009). Además, para los HSH, la probabilidad de presentar infecciones múltiples (61%) y con tipos de alto riesgo oncogénico (65%) es también muy elevada (Hessol *et al.*, 2009). En España, los datos de la prevalencia de infección por VPH en pacientes infectados por VIH son escasos. Para las mujeres, los datos descritos por un estudio publicado en el año 2009 en una cohorte de 139 mujeres seguidas durante cuatro años (1999-2003), establecen una prevalencia de infección cervical por VPH del 63% (Videla *et al.*, 2009). Entre los hombres, un estudio publicado en el año 2006 describió una prevalencia global de infección anal por VPH del 78%, siendo 83% en HSH y del 68% en hombres heterosexuales (Sirera *et al.*, 2006). En un estudio realizado en el año 2010 por Ortiz *et al.* en una cohorte abierta, multicéntrica y prospectiva de pacientes infectados por VIH-1 y sin tratamiento con antirretrovirales cuando se incluyen en la cohorte, describen una prevalencia de infección anal por VPH del 88% para HSH y del 65% y 55% de infección anal y cervical, respectivamente en mujeres.

## 1.7. MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VPH

La introducción de los métodos moleculares en el diagnóstico del VPH y la caracterización de tipos y variantes ha sido de gran utilidad en el conocimiento de la infección, dadas las limitaciones derivadas de la ausencia de sistemas de cultivos *in vitro* del VPH.

### 1.7.1. Identificación directa

La mayor parte de los métodos de identificación directa de infección por VPH están basados en la detección del ADN del virus, aunque también se han desarrollado sistemas basados en la detección del ARN y de las proteínas virales.

#### 1.7.1.1. Sistemas de hibridación

El *Southern blotting* es el primer método utilizado en la detección de VPH en muestras clínicas. De manera esquemática, el ADN extraído de la muestra se digiere con una o

más enzimas de restricción y posteriormente los productos resultantes se separan por electroforesis en gel de agarosa y son transferidos a un soporte de nitrocelulosa o nylon. Por último, se lleva a cabo una hibridación con sondas específicas de VPH marcadas con fósforo-32. Puede ser utilizado desde el punto de vista diagnóstico, aunque con ciertas limitaciones: es dependiente de la cantidad y la calidad del ADN purificado, del tamaño de la sonda y de la cantidad de ADN transferido, y requiere grandes cantidades de muestra. Es una técnica laboriosa y además requiere la utilización de radioactividad, por lo que su utilización se ha reemplazado por métodos de hibridación más prácticos que permitan el análisis de un elevado número de muestras (Southern, 1975; Schiffman *et al.*, 1991; Hubbard, 2003).

La **hibridación *in situ*** es una técnica aplicada normalmente a muestras citológicas e histológicas que son permeabilizadas mediante la utilización de enzimas o detergentes, de manera que se permita la accesibilidad de sondas marcadas que hibridan de forma específica con el ADN de VPH en el interior del núcleo celular. Para la identificación de los tipos de VPH se requiere el uso de sondas tipo-específicas y múltiples ensayos de hibridación, lo que hace que se convierta en una técnica demasiado laboriosa para realizarla sobre un elevado número de muestras. Su especificidad comparada con PCR es mayor, y por ello se considera más como una técnica confirmatoria de la presencia de VPH en biopsias cuyo diagnóstico es dudoso. Es posible la utilización de sondas marcadas con radioactividad pero, dada la necesidad de instalaciones adecuadas y personal debidamente entrenado para la manipulación de las mismas, no es de elección para su uso de manera rutinaria. Las técnicas no isotópicas para detección colorimétrica o quimiluminiscente utilizan sondas marcadas con biotina y digoxigenina que permiten una localización más precisa de la reacción, además de ser más estables y económicas (Hubbard, 2003).

El **ensayo de captura de híbridos** (hc2 *High-Risk HPV DNA Test*®, Qiagen, Alemania) para la detección del ADN de VPH está basado en la hibridación en solución de un elevado número de sondas de ARN sintéticas, complementarias a la secuencia específica de 18 tipos de VPH. La prueba se presenta en dos formatos independientes, la detección únicamente de 13 tipos de AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) o la detección de los tipos de AR y BR (6, 11, 42, 43, 44). Los resultados se expresan como unidades de luz relativas y son proporcionales a la cantidad del ADN de VPH presente en la muestra biológica, lo que aporta una medida semicuantitativa de la carga viral. El valor de corte a partir del cual se establece un resultado como positivo es de 1.0 unidad de luz relativa (equivalente a 1.0 pg de ADN de VPH por 1.0 ml de muestra). El límite de detección de este ensayo es de 1 pg/ml de muestra, lo que equivale a 100.000 copias de VPH por ml de muestra (instrucciones del fabricante).

El ensayo de captura de híbridos es de fácil aplicación y adecuado para la automatización y el procesamiento de un elevado número de muestras, sin embargo aunque es la metodología recomendada por la FDA (*Food and Drug Administration*, EE.UU) para la detección de la infección por VPH en muestras cérvico uterinas, se han descrito algunas limitaciones en la técnica, como es la hibridación cruzada con los tipos VPH6 y VPH42 para la sonda de alto riesgo, y en menor medida para los tipos VPH40, VPH53 y VPH66 (Meyer *et al.*, 1998).

#### **1.7.1.2. Ensayos basados en amplificación por PCR**

La sensibilidad y especificidad de los métodos basados en técnicas de amplificación por PCR varían dependiendo de los cebadores utilizados, el tamaño del producto, la polimerasa empleada, el tipo de VPH amplificado y la capacidad del sistema para detectar múltiples tipos. Para la detección y caracterización de tipos de VPH mediante PCR se pueden utilizar cebadores específicos de tipo, que se han diseñado clásicamente en regiones del genoma con un elevado polimorfismo entre los distintos tipos virales, tales como las regiones que codifican para las proteínas virales E6 y E7 o sistemas de cebadores consenso o genéricos que se diseñan en regiones altamente conservadas en los diferentes tipos de VPH, como es la región que codifica para la proteína viral L1. El primer diseño permite amplificar un solo tipo de VPH en cada reacción, de manera que es necesario realizar múltiples reacciones separadas de una misma muestra para la identificación de tipos, o bien diseñar sistemas de amplificación múltiples utilizando diferentes mezclas de cebadores en una misma reacción (PCR multiplex). La utilización de cebadores consenso o genéricos permite la detección de un amplio número de tipos de VPH. Entre los diferentes sistemas de cebadores genéricos utilizados de forma clásica podemos hablar de diferentes diseños: sistema de GP5/6 y su versión modificada GP5+/6+ (Van der Brule *et al.*, 1990; De Roda *et al.*, 1995), sistema MY09/11 (Manos *et al.*, 1994), sistema PGMY09/11 (Gravitt *et al.*, 2000) y sistema SF1/2 (Kleter *et al.*, 1998). En la actualidad existen diferentes metodologías en el mercado estandarizadas y validadas para la detección de VPH mediante sistemas de amplificación, como el *Amplikor® Human Papillomavirus (HPV) DNA Test* (Roche Molecular Diagnostics, EE.UU). La prueba utiliza la amplificación del ADN de VPH de 13 tipos de AR empleando cebadores marcados con biotina en su extremo 5', amplificando un fragmento de 170 pb en la región que codifica para la proteína viral L1 y tras la amplificación, la doble banda del ADN es desnaturalizada en condiciones alcalinas para permitir la posterior hibridación de los productos de PCR a pocillos de microplacas recubiertos de sondas oligonucleotídicas de VPH. Los híbridos son detectados posteriormente mediante una reacción colorimétrica.

La caracterización de tipos mediante la utilización de estos sistemas de cebadores genéricos requiere el análisis posterior de los productos amplificados por diferentes sistemas: análisis de los patrones de restricción, secuenciación genómica e hibridación indirecta. El análisis de los productos amplificados mediante análisis de patrones de restricción es una técnica en desuso debido a la complejidad de interpretación de resultados en muestras infectadas por múltiples tipos. La secuenciación genómica es una tipificación directa e inequívoca que permite distinguir las variantes y polimorfismos virales de VPH. Existen diferentes métodos de secuenciación genómica, empleando tanto cebadores como dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) marcados con fluorocromos. El último es el método más ampliamente utilizado, dado que el marcaje de un elevado número de cebadores aumenta significativamente el coste de la técnica. La asignación del tipo de VPH se lleva a cabo por comparación de la secuencia obtenida con las secuencias de referencia de los diferentes tipos de VPH de bases de datos internacionales, bien en base únicamente a la homología de secuencia o bien mediante el análisis filogenético de las mismas. Esta metodología no es adecuada en muestras infectadas por múltiples tipos, ya que la secuencia obtenida corresponde solo al tipo de VPH mayoritario. El análisis de los productos amplificados mediante hibridación indirecta es la metodología más utilizada actualmente. La amplificación por PCR se lleva a cabo con cebadores marcados con biotina en su extremo 5' y, tras la amplificación, la doble banda del ADN es desnaturalizada en condiciones alcalinas para permitir la posterior hibridación de los productos de PCR a tiras de nitrocelulosa en la que están fijadas múltiples sondas para diferentes tipos de VPH. Los híbridos son detectados posteriormente mediante una reacción colorimétrica. La estandarización del método en formato tira está disponible bajo la denominación de *Lineal Probe Assay®* o *INNO LiPA HPV Genotyping* (Innogenetics, Bélgica) y *Linear Array® Human Papillomavirus (HPV) Test* (Roche Molecular Diagnostics, EE.UU). Ambas son aplicables, desde el punto de vista metodológico, al estudio de un elevado número de muestras cuando se utilizan sistemas automatizados, permitiendo la detección de infecciones múltiples, aunque con un coste relativamente elevado. La prueba *LiPA®* amplifica un fragmento de 65 pb en la región que codifica para la proteína L1 y permite la detección de 28 tipos de VPH de AR y BR. En el caso de *Linear Array®*, el fragmento amplificado es de, aproximadamente, 450 pb en la misma región, y permite la detección de 37 tipos de VPH de AR y BR.

Este formato de hibridación en fase sólida es el fundamento de las nuevas tecnologías de arrays y chips de ADN, en auge en los últimos años. El formato comercial de la tecnología de array se denomina *CLART® Papillomavirus 2* (Genómica S.A.U, España) y está diseñado para



la detección de 35 tipos de VPH de AR y BR. La principal ventaja que presentan con respecto a los ensayos clásicos es que permiten el análisis de un elevado número de muestras.

Recientemente, se han desarrollado diferentes metodologías para la cuantificación de la carga viral de VPH y para la determinación del estado de integración del genoma, aunque no está claramente definida su utilidad en el diagnóstico clínico. De la misma manera, se han desarrollado técnicas de detección de expresión de los oncogenes virales *e6* y *e7* para algunos tipos de alto riesgo basadas en métodos de amplificación isotérmica del ARN viral combinada con detección a tiempo real (NASBA, *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*, *PreTect HPV Proofer*, *NorChip*, *Noruega*) y en formato de hibridación *in situ* empleando sondas marcadas con fluorocromos (FISH, *Fluorescent In Situ Hibridation*, *HPV Oncotect*, *Labec Pharma*, EE.UU).

### 1.7.2. Identificación indirecta. Ensayos serológicos

La infección con VPH genital va seguida de una respuesta inmune tanto de tipo celular como de tipo humoral, esta última dirigida fundamentalmente frente a las proteínas de la cápsida viral. Los anticuerpos anti-VPH, podrían ser indicadores de infecciones recientes y pasadas. La seroconversión ocurre entre los 6 y los 18 meses después de la detección del ADN de VPH, pero en pacientes con detección transitoria de ADN tiene lugar con poca frecuencia. Los anticuerpos frente a proteínas de la cápsida están por tanto asociados con la detección persistente de ADN y son detectables durante muchos años (Combata *et al.*, 2002, Touzé *et al.*, 2001).

Los ensayos serológicos de VPH no se utilizan en el diagnóstico habitual y hasta el momento los métodos comerciales estandarizados y validados son escasos. Las limitaciones de los métodos serológicos en el estudio de la infección por VPH, desde el punto de vista clínico, están asociadas con la gran variedad de tipos, con las reacciones cruzadas que existen entre diversos tipos, y la respuesta inmunológica variable (la ausencia de anticuerpos no implica, como en otras infecciones víricas, la ausencia de infección) (Nindl *et al.*, 2000; Coursaget, 2003; Iftner *et al.*, 2003). Algunos de estos ensayos se basan en la utilización de VLP originadas por el autoensamblaje de la proteína de fusión L1 o L1/L2, unidas a soportes sólidos para detectar los anticuerpos presentes en el suero frente a las proteínas estructurales. Las VLP son, de manera global específicas de tipo, excepto en los tipos 6 y 11 que presentan reactividad cruzada y en los tipos 31 y 45 en los que se ha descrito bajos niveles de reactividad cruzada con VPH33 y VPH18. También se ha observado reactividad cruzada entre VPH16 y VPH31 y entre los tipos 58 y 18, 45 y 59 (Giroglou *et al.*, 2001). Otra estrategia establece el uso de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes del VPH, producidas en diferentes sistemas de expresión

tanto procariotas como eucariotas (Strickler *et al.*, 1998; Konya *et al.*, 2001; Palker *et al.*, 2001; Sehr *et al.*, 2002; Karem *et al.*, 2002; Iftner *et al.*, 2003). La técnica de enzimoimmunoanálisis en fase sólida (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) con antígenos VLP es específica de tipo y la más frecuentemente utilizada. Sin embargo la sensibilidad de la técnica varía entre el 50-60%, en función del antígeno y protocolo utilizado. El desarrollo de ensayos competitivos en formato múltiple (Luminex, EE.UU) permite la detección de anticuerpos frente a diferentes tipos del VPH simultáneamente y aunque estos ensayos son complejos a la hora de realizarse, su especificidad es muy elevada. Una limitación importante en la estandarización y validación de sistemas de detección de anticuerpos frente al VPH, es la carencia de paneles de sueros y antígenos de referencia validados internacionalmente frente a los distintos tipos del VPH. En los últimos años, se ha planteado la utilización de la detección de anticuerpos IgA en las secreciones genitales como un marcador directo de la infección, sin embargo, la reproducibilidad y estandarización de estos métodos de detección está todavía en fases preliminares (Snowwhite *et al.*, 2002; Iftner *et al.*, 2003).

## **1.8. VACUNAS PROFILÁCTICAS**

La vacunación es, en este momento, una de las estrategias de prevención de las enfermedades relacionadas con VPH, aunque ésta en ningún caso es un sustituto de los programas de cribado de cáncer cervical, y los individuos vacunados deben observar las mismas actuaciones. En el mercado existen dos vacunas que se diferencian en la forma de obtención del antígeno, en el número y tipo de antígenos incluidos, en la concentración de alguno de ellos, en el adyuvante utilizado en su composición, la metodología de desarrollo e investigación clínica, los objetivos y sistemas de valoración utilizados para éstos. La vacuna profiláctica tetravalente (VPH6-11-16-18 [Gardasil®; Merck & Co., EE.UU]) contiene VLPs de la proteína L1 de los tipos 6, 11, 16 y 18 producidas en *Saccharomyces cerevisiae* (Carter *et al.*, 2001; Garland *et al.*, 2007) y la vacuna profiláctica bivalente (VPH16-18 [Cervarix®; GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica]) contiene VLPs de la proteína L1 de los tipos 16 y 18, obtenida mediante la replicación de baculovirus recombinantes en células de insecto Sf9 y Hi5. Ambas vacunas son administradas por vía intramuscular en un calendario de tres dosis, presentando sólo una ligera diferencia para la segunda dosis. La protección conferida por las dos vacunas es muy alta en mujeres de edades entre 15 y 26 años, tanto en la prevención de la infección como de las enfermedades asociadas a los tipos que incluyen. Los datos de la eficacia de prevención de CIN I, obtenidos en los ensayos clínicos de las vacunas bivalente y tetravalente para VPH16 y VPH18 varían desde 89,2% hasta el 100%, respectivamente (Pavoneen *et al.*, 2007; Garland *et*

*al.*, 2007); y en el caso de CIN II/CIN III varían desde 90,4% hasta el 98%, respectivamente (Pavoneen *et al.*, 2007; FUTURE II Study Group 2007). La vacunación tetravalente ha mostrado una eficacia que varía del 91-100% en lesiones precursoras de grado II y III de cáncer vulvar y vaginal, cuando los tipos implicados son el 6, 11, 16 y 18 y del 96-100% en verrugas genitales (Garland *et al.*, 2007). Para la vacuna bivalente los datos también demuestran una eficacia de entre el 21,9% y el 32,8% para infecciones cervicales con cualquier otro tipo de VPH persistente durante seis meses o un año. Los datos actuales no indican que las vacunas tengan efectos terapéuticos en las mujeres que están infectadas en el momento de la vacunación; la vacuna tetravalente no impide la progresión de la enfermedad o la regresión de una lesión existente (FUTURE II Study Group 2007), y en el caso de la vacuna bivalente, tampoco se describen mejoras en la aclaración de la infección (Hildesheim *et al.*, 2007). Por esta razón, la vacuna produce su máximo beneficio cuando es administrada antes del comienzo de las relaciones sexuales. Debido a que la vacuna no está sintetizada a partir de virus atenuados, puede ser administrada en individuos inmunodeprimidos, sin embargo la eficacia puede ser menor que en los individuos inmunocompetentes. Ambas vacunas han mostrado protecciones cruzadas para otros tipos relacionados filogenéticamente con los incluidos en la vacuna. En el caso de VPH16 se describe para VPH31, 33, 35, 52 y 58, y en VPH18 se describen para los tipos VPH9, 45, 59 y 68 (Brown *et al.*, 2007). Además, algunos autores han indicado que la vacunación puede resultar en cambios en el cribado futuro de cáncer cervical, posiblemente debidos a cambios en el nicho ecológico viral (Dunne *et al.*, 2008).

Las dos vacunas fueron aprobadas por la Agencia Europea de los Medicamentos de la Unión Europea (EMA, *European Medicines Agency*) en septiembre de 2006 (Gardasil®) y septiembre de 2007 (Cervarix®), y en la actualidad ambas son administradas en gran parte de los países europeos. En España, en el año 2007 el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud acordó incluir la vacuna frente a VPH en los calendarios vacunales oficiales de las Comunidades Autónomas. La vacunación se lleva a cabo en niñas con edades que oscilan entre los 11 y 14 años, según la Comunidad Autónoma.

## 1.9. VARIANTES DE VPH

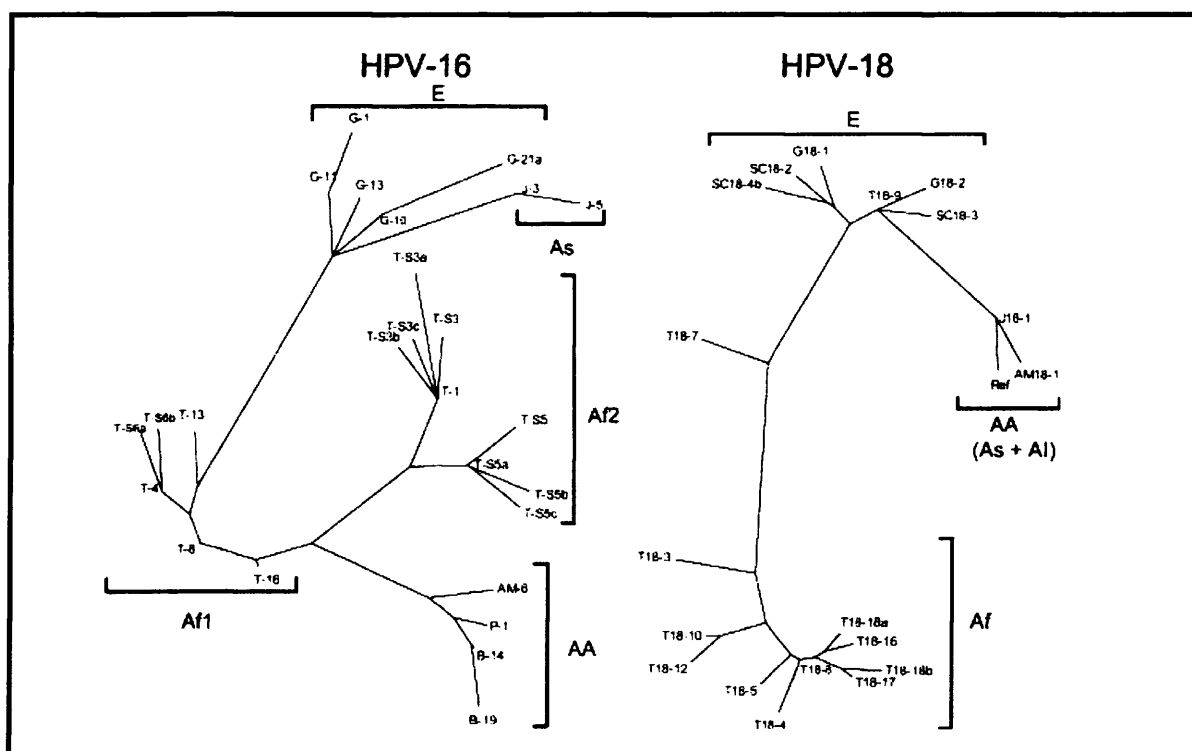
Los virus papiloma tienen un genoma muy conservado y los cambios en la secuencia debidos a mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o procesos de recombinación, tan frecuentes en virus ARN, son eventos que ocurren con una probabilidad muy baja (de Villiers *et al.*, 2004). Estas variaciones que se producen en el genoma, y que ocurren de manera fortuita, llegan a establecerse en la población si hay algún mecanismo que los seleccione positivamente,

o si esas mutaciones son funcionalmente neutrales, por expansión selectiva de la población hospedadora del mutante (deriva genética).

En el caso de VPH, existen datos suficientes que muestran la diversidad de variantes para cualquier tipo y el interés en su estudio está creciendo rápidamente (Stewart *et al.*, 1996; Calleja-Macias *et al.*, 2004, 2005; Prado *et al.*, 2005). Las variantes de VPH presentan diferencias en sus propiedades biológicas y bioquímicas, por esta razón se ha asumido que deben tener diferencias en su patogenicidad, pudiendo tener implicaciones en la evolución de la infección y afectar a su potencial oncogénico (Giannoudis *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2006). Los estudios de análisis comparativo de las secuencias han permitido establecer ciertas características de sus relaciones filogenéticas, centrándose la mayor parte de ellos en la variabilidad para los tipos que infectan la mucosa genital debido a su relevancia clínica, entre ellos: VPH16 (Ho *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1997; Pillai *et al.*, 2002, 2009; De Boer *et al.*, 2004; Del Refugio *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Tornesello *et al.*, 2008a/b), seguido por VPH18 y 45 (Ong *et al.*, 1993; De la Cruz *et al.*, 2005; De Boer *et al.*, 2005; Cerqueira *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009), VPH6 y 11 (Heinzel *et al.*, 1995), VPH5 y 8 (Deau *et al.*, 1991) y más recientemente 31, 33, 35, 52 y 58 (Xin *et al.*, 2001; Aho *et al.*, 2003, 2004; Calleja-Macias *et al.*, 2004; Gagnon *et al.*, 2004, 2005, 2007; Raiol *et al.*, 2009). Debido a su prevalencia en el cáncer cervical y las lesiones previas, la heterogeneidad intratipo de VPH16 ha sido la más estudiada y así en el año 1993, Ho *et al.* analizaron la región reguladora del genoma de VPH16 de una colección de muestras cervicales procedentes de diferentes regiones del mundo, y demostraron que las variaciones en la secuencia formaban cinco ramas filogenéticas diferentes. Aunque existían representantes de cada rama filogenética en todas las poblaciones del mundo, se describieron patrones concretos que diferían en su localización geográfica y en el origen étnico de los pacientes, de forma que en el árbol filogenético la nomenclatura reflejaba el origen geográfico de los aislados que lo formaban: Africana tipo 1, Africana tipo 2, Asiática, Asiático-América, Europea (**Figura 1.8**).

Estudios posteriores, que se realizaron empleando como metodología la hibridación con sondas biotiniladas e incluyendo además otras regiones genómicas (E6, L1 y L2) y el genoma completo (Yamada *et al.* 1995; Wheeler *et al.* 1997, Chen *et al.* 2005), complementaron esta clasificación y demostraron una fuerte relación entre la covariación de la secuencia de los genes para los aislados de VPH16, confirmando que las variaciones nucleotídicas podían usarse para distinguir linajes de virus diferentes y su asociación con la displasia de alto grado y/o cáncer. Se han propuesto ramas menores, como la denominada Norte Americana, que corresponde a variantes detectadas en los indios norteamericanos, aunque el número de

aislados es más limitado. (Yamada *et al.*, 1997; Wheeler *et al.*, 1997). En el año 2011, Huertas-Salgado *et al.*, han propuesto un nuevo criterio de clasificación y nomenclatura de las variantes de VPH16 en la región codificante de la proteína E6, mediante el análisis descriptivo y comparativo de las secuencias nucleotídicas publicadas desde el año 1991 al 2010. En la rana Europea se han descrito tres clases (E-350T, E-350G y E-350A), en la rama Asiática tres (Asa, Asb y Asc), en la rama Asiático-Americana tres (AAa, AAb y AAC), en la rama Africana tipo 1 seis (Af1a, Af1b, Af1c, Af1d, Af1e y Af1u) y en la rama Africana tipo 2 tres (Af2a, Af2b y Af2c).



**Figura 1.8.** Árboles filogenéticos de las variantes de VPH16 y VPH18. Distribución de las ramas filogenéticas basadas en el análisis de las bases de datos publicadas. Af, Africana; Af-1, Africana tipo 1; Af-2, Africana tipo 2; As, Asiática; AA, Asiático-Americana; AsAi, Asiático-Amerindia; E, Europea. (Tomado de Bernard *et al.*, 2006).

Un estudio similar se llevó a cabo con VPH18, de manera inicial en la región reguladora (Ong *et al.*, 1993) y más adelante en otras regiones del genoma (Arias-pulido *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos llevaron a la construcción de un árbol filogenético con una topología similar que la obtenida para VPH16, que incluía las variantes denominadas: Africana, Asiático-Amerindia y Europea (Figura 1.8). Las relaciones filogenéticas obtenidas son reflejo de la evolución y los patrones migratorios de las poblaciones humanas (Bernard *et al.*, 1994), y sugieren que ciertas variantes pudieron divergir en el mismo tiempo en que se formaron los principales grupos étnicos humanos. Los estudios de diversidad intratipo

llevados a cabo para otros tipos de VPH confirman que ésta es más limitada, así como su diversidad geográfica, lo que sugiere tasas de evolución molecular más bajas que las observadas en los tipos VPH16 y VPH18 (Calleja-Macías *et al.*, 2005).

La secuencia de referencia o prototipo para las variantes de VPH16 pertenece a la rama Europea y fue aislada de un paciente de origen alemán. En VPH18 la secuencia de referencia utilizada pertenece a la rama Asiático-Amerindia y fue aislada de un paciente de origen brasileño. En el resto de variantes asociadas a los tipos estudiados en este trabajo, las secuencias de referencia fueron aisladas de un paciente alemán en VPH31, de un paciente francés en VPH33 y de un paciente de Estados Unidos en VPH52.

### **1.9.1. Significado funcional de las variantes**

Como ya se ha indicado, los estudios de variantes de VPH se han dirigido fundamentalmente al tipo 16 debido a su prevalencia, al ser el tipo más detectado en población general, y a su importancia en el desarrollo de cáncer cervical, al ser un tipo de alto riesgo oncogénico. Para este tipo, los datos obtenidos de los diferentes estudios comparando variantes de origen Europeo (prototipo) con variantes de origen no Europeo, indican que estas últimas están asociadas con un mayor riesgo de desarrollo de lesiones cervicales (Xi *et al.*, 1997; Villa *et al.*, 2000; Hildesheim *et al.*, 2001; Berumen *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2002); sin embargo los datos son contradictorios ya que algunos estudios apuntan que no existe tal asociación (Schlecht *et al.*, 2005; Rajeevan *et al.*, 2005; Beskow *et al.*, 2005). Las diferencias en estos resultados podrían reflejar las diferencias genéticas entre las poblaciones, en concreto polimorfismos genéticos del complejo mayor de histocompatibilidad (Zehbe *et al.*, 1998a; Zehbe *et al.*, 2001), o podrían deberse al predominio de las variantes Europeas en las poblaciones de estudio. Los estudios dirigidos a otras poblaciones (Xi *et al.*, 1997; Villa *et al.*, 2000; Berumen *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2002; Tornesello *et al.*, 2004; Sichero *et al.*, 2007) han señalado un mayor riesgo de cáncer cervical y de las lesiones de alto grado en pacientes infectados por variantes no Europeas, especialmente para las Asiático-Americanas (Hildesheim *et al.*, 2002; Bernard *et al.*, 2006). En general, los estudios llevados a cabo para VPH16 presentan un diseño transversal y aunque se han llevado a cabo algunos con diseño longitudinal los tamaños muestrales son pequeños, hecho que también dificulta la interpretación de los resultados para distinguir los riesgos asociados a las variantes que pertenecen a linajes no Europeos (Xi *et al.*, 1997; Bontkes *et al.*, 1998; Villa *et al.*, 2000; Xi *et al.*, 2002).

La relevancia clínica de las variantes de VPH18 es más desconocida, aunque es el tipo más detectado en cáncer cervical después de VPH16, y el tipo más asociado con adenocarcinoma cervical. Los trabajos de variantes para este tipo aunque son más escasos, indican que ciertas variantes se identifican más en los adenocarcinomas y otros cánceres del tipo escamoso (Lizano *et al.*, 1997; Burk *et al.*, 2003; De Boer *et al.*, 2005) y, al igual que para VPH16, se describe además un mayor riesgo de anomalías citológicas de alto grado asociadas a las variantes no Europeas cuando se comparan con las variantes Europeas (Villa *et al.*, 2000). En un estudio publicado en Estados Unidos, se describen además diferencias en la persistencia de la infección de las variantes de VPH16 y VPH18 asociadas al área geográfica de procedencia de los pacientes. Los resultados del trabajo, indican que en mujeres americanas de origen africano persisten más las variantes Africanas y en mujeres con diferente origen son más persistentes las variantes Europeas (Xi *et al.*, 2006).

Las diferencias en la patogeneicidad de las variantes pueden deberse a cambios en las regiones codificantes de las proteínas virales o los elementos reguladores presentes en el genoma del virus. Por ejemplo, las tasas de transcripción y replicación pueden verse afectadas por la alteración de elementos de respuesta en *cis*; cambios de aminoácidos en la secuencia proteica de las proteínas virales E6 y E7 que pueden alterar la función transformadora de estas oncoproteínas; y cambios en la secuencia de la proteína viral L1 pueden afectar a la eficacia de la infección o alterar la antigenicidad viral (Kirnbauer *et al.*, 1993). Además, estos cambios de manera simultánea en varias dianas, pueden modular sinérgicamente la patogenicidad, lo que puede ocurrir indirectamente a través de cambios que influyan la persistencia viral. Un gran número de los estudios se han centrado en las variaciones en las oncoproteínas E6 y E7 debido a que en los carcinomas en los que se detecta VPH, ambas proteínas se expresan de manera conjunta y es conocido que interactúan con importantes factores celulares implicados en el ciclo celular, en concreto las proteínas celulares p53 y Rb, participando de manera directa en el proceso de transformación (Hildesheim *et al.*, 2001). De esta forma, en un estudio realizado entre mujeres inglesas con lesiones citológicas cervicales se identificó una variante de VPH16 asociada con la persistencia viral y con la progresión de CIN II a CIN III. Esta variante de la región codificante de la proteína viral E6 tiene una sustitución de timina a guanina en la posición nucleotídica 350, y la mutación resulta en un cambio del aminoácido en posición 83 de Leucina a Valina (L83V) que está presente en las variantes incluidas en las líneas filogenéticas Europeas y Asiático-Americanas (Londesborough *et al.*, 1996). Esta variante de VPH16 se identificó más frecuentemente en muestras de mujeres diagnosticadas con carcinoma invasivo que con CIN de grado III en un estudio llevado a cabo en Suecia (Zehbe *et*

*al.*, 1998b), y las variantes múltiples de la proteína viral E6 (que tenían más de un cambio de aminoácido) se distribuían de manera homogénea en los dos estadios histológicos. Sin embargo, en un estudio realizado por los mismos autores, la secuencia prototipo de la proteína viral E6 se distribuyó de manera homogénea en CIN y carcinoma invasivo, y la variante L83V sólo se detectó entre las lesiones precursoras de alto grado, cuando se analizó una población de mujeres procedentes de Italia. En esta población, el porcentaje de las variantes de la proteína E6 múltiples era dos veces mayor en las mujeres con carcinoma invasivo (Zehbe *et al.*, 1998a). Las diferencias en los resultados descritos entre los trabajos publicados pueden reflejar las variaciones asociadas al diseño del estudio, la población y el número de pacientes examinados. Además, la oncogenicidad de la variante L83V puede variar geográficamente, posiblemente debido a diferencias genéticas con implicaciones en la respuesta inmune celular, por ejemplo los haplotipos en el complejo mayor de histocompatibilidad. En el caso de la proteína viral E7, varios grupos que han investigado distintas poblaciones y las variaciones de la secuencia nucleotídica, fundamentalmente para VPH16, indican que la proteína E7 está altamente conservada *in vivo* (Zehbe *et al.*, 1998b; Veress *et al.*, 1999; Nindl *et al.*, 1999). Sin embargo en un estudio entre mujeres coreanas, se detectó el prototipo de la proteína en el 10% de los carcinomas invasivos y la variante más común (Asparagina a Serina en el codón 29; N29S) se localizó en el 70% de los carcinomas invasivos (Song *et al.*, 1997). Los estudios de variación de secuencia de la región reguladora, en el caso concreto de VPH16, han atribuido diferencias funcionales en las tasas de replicación (Hubert, 2005) así como en las actividades transcripcionales del promotor de E6 cuando se comparan con la prototipo (Park *et al.*, 1999; Kammer *et al.*, 2002). Algunos estudios sugieren que las variaciones de secuencia en esta región, afectan a los sitios de unión de los factores de transcripción tanto para VPH16 como VPH18 (Londesborough *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 1998; Sichero *et al.*, 2005). En esta línea se describen los resultados de un trabajo publicado en el año 1994, en el que los autores refieren que las variantes Europeas de VPH16 que contenían mutaciones puntuales o deleciones en los sitios de unión del factor de transcripción ying-yang 1 (YY-1, *Factor Yin Yang 1*) aisladas de carcinomas cervicales, mostraban actividades transcripcionales más elevadas cuando se comparaban con muestras que contenían la secuencia de referencia (Dong *et al.*, 1994); aunque estudios posteriores similares no permitieron concluir que las mutaciones en la secuencia nucleotídica en los sitios de unión del factor YY-1 asociadas a ciertas variantes, estuvieran funcionalmente relacionadas con el desarrollo de la neoplasia cervical (Park *et al.*, 1999; Veress *et al.*, 1999). Los distintos estudios han identificado que además de factores virales, hay factores asociados al hospedador, como diferencias en los haplotipos para el complejo mayor de



histocompatibilidad (Apple *et al.*, 1994; Ellis *et al.*, 1995; Lenner *et al.*, 1995; Lie *et al.*, 1999) o polimorfismos en las dianas de unión celular de las proteínas virales, tales como el polimorfismo en el codón 72 de p53 (Storey *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999). Estos cambios están asociados con variantes específicas en cánceres invasivos (Bontkes *et al.*, 1998; Rosenthal *et al.*, 1998; Brady *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Cuzick *et al.*, 2000; Van Duin *et al.*, 2000); pero están sin definir otras posibles dianas celulares de las proteínas de VPH que puedan ser igualmente importantes.

Como hemos indicado, la oncogenicidad de las diferentes variantes de VPH parece variar geográficamente y con el origen étnico de la población estudiada, pero debido a que el proceso de transformación tiene múltiples pasos y a que la relación entre las variantes de VPH y otros factores no virales es compleja, es necesario todavía profundizar en su estudio. Los datos bibliográficos indican que las variaciones intratipo de la secuencia representan un importante factor de riesgo para el desarrollo de lesiones precursoras y neoplasia cervical invasiva en las mujeres; sin embargo en los hombres, los estudios de variantes de VPH son escasos y se centran fundamentalmente en la infección por VPH en el pene (Gregoire *et al.*, 1995; Tornesello *et al.*, 2000; Kalantari *et al.*, 2008; Tornesello *et al.*, 2008a), aún cuando la infección en el canal anal es más frecuente (Xi *et al.*, 1993, 1998; Da Costa *et al.*, 2002). De la misma forma, el estudio de las variantes de VPH entre personas infectadas por VIH es también escaso, aunque en los pacientes inmunodeprimidos debido al deterioro del sistema inmune podría esperarse que la historia natural de las variantes fuera particularmente agresiva (Chatuverdi *et al.*, 2004; Schlecht *et al.*, 2005; Tornesello *et al.*, 2008b; Tanzi *et al.*, 2009). En España en el año 2001, se publicó un estudio de caracterización de variantes de VPH16 en pacientes infectados o no por VIH, con citologías cervicales alteradas (Pérez-Gallego *et al.*, 2001). En el año 2006, Ortiz M *et al.* describieron las variantes de VPH16 circulantes en dos grupos de población de alto riesgo para la infección por VPH, mujeres que ejercen la prostitución y mujeres recluidas en prisión.





## **2. OBJETIVOS**

La infección por el VPH es la más frecuente de las infecciones de transmisión sexual en el mundo, y juega un papel central en la patogénesis de los cánceres anogenitales y sus lesiones precursoras. En el caso del cáncer de ano, y a pesar de las bajas tasas de incidencia del mismo que se han descrito a nivel mundial (0,1-2,8 casos por 100.000 en los hombres; 0,0-2,2 casos por 100.000 en las mujeres), en los últimos 50 años se ha descrito un incremento de la tendencia en su incidencia especialmente mayor en HSH y en los adultos infectados por VIH. Los datos publicados en los trabajos llevados a cabo en hombres con cáncer de ano, describen la presencia de VPH en el 71,2% de los casos, siendo VPH16 el tipo más prevalente (65,6%), seguido de VPH18 (5,1%). En el caso particular de la infección anal por VPH en HSH la mayoría de trabajos se han realizado en hombres que están coinfectados por VIH, y los valores de prevalencia de infección que se describen son especialmente elevados (85-97,9%).

El VPH es clasificado en tipos, subtipos o variantes, basándose en el grado de homología del genoma viral, de forma que cuando estas variaciones son menores del 2% se puede hablar de variantes intratipo. Los estudios de variantes de los tipos de alto riesgo oncogénico 16 y 18, indican que existen diferencias en sus propiedades biológicas y bioquímicas, razón por la que se ha asumido que deben tener diferencias en su patogenicidad, que pueden tener implicaciones en la evolución de la infección y afectar a su potencial oncogénico. La mayoría de estos estudios de variantes se han llevado a cabo en muestras cervicales, debido a la importancia que el cáncer de cérvix tiene en Salud Pública. Sin embargo, como consecuencia de los elevados valores de prevalencia de infección de VPH y el incremento de la incidencia del cáncer de ano descritos en los HSH, especialmente aquellos que están infectados por VIH, se plantea la posibilidad de identificar y estudiar las variantes intratipo no sólo de los tipos de alto riesgo 16 y 18, sino también de otros tipos de VPH que se detectan con prevalencias menores, en este grupo de población.

### **2.1. Objetivo general**

El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de la prevalencia de infección anal por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo oncogénico global y tipo específica en hombres que practican sexo con hombres (HSH) infectados y no infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), así como el análisis de las variantes de los tipos de papilomavirus humanos 16, 18, 31, 33 y 52 de alto riesgo oncogénico considerados de mayor relevancia en el cáncer anal.

## **2.2. Objetivos específicos**

### **2.2.1. Estudio de la prevalencia de infección anal por VPH de alto riesgo, global y tipo específica, en muestras procedentes de HSH, infectados y no infectados por el VIH-1.**

- Determinar la prevalencia de infección por VPH de alto riesgo oncogénico y evaluar las diferencias en base a la presencia o no de infección por el VIH-1, la edad y el origen geográfico de los pacientes.
- Establecer la distribución de los diferentes genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico, así como el porcentaje de infecciones múltiples, y evaluar las diferencias en pacientes infectados y no infectados por el VIH-1.

### **2.2.2. Caracterización molecular de las variantes de los tipos de papilomavirus humanos 6, 18, 31, 33 y 52 en muestras anales procedentes de HSH, infectados y no infectados por el VIH-1.**

- Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos en las regiones codificantes de las proteínas virales E6 y E7 y la región reguladora.
- Estudio de los polimorfismos de nucleótidos en las regiones codificantes de las proteínas virales E6 y E7 y la región reguladora.
- Relevancia de las mutaciones observadas a nivel de traducción de las proteínas (polimorfismos en las regiones codificantes de E6 y E7) y en la regulación de la transcripción (polimorfismos en la región reguladora).

### **2.2.3. Análisis de la distribución de las variantes intratipo de acuerdo a la presencia o no de infección por el VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.**





### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Controles de laboratorio

###### 3.1.1.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para realizar los controles internos de laboratorio se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y fueron: a) células HeLa (ATCC no. CCL2.1), línea celular epitelial humana de adenocarcinoma cervical infectada con VPH18 que contiene aproximadamente 25 copias por célula (**Figura 3.1**) y; b) células SiHa (ATCC no. HTB35), línea celular epitelial humana de carcinoma escamoso celular de cérvix (grado II) infectada con una copia por célula de VPH16.



**Figura 3.1. Células HeLa.** (Tomado de Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid).

###### 3.1.1.2. Muestras clínicas

Extracciones de ADN de raspados cervicales y anales anonimizados, obtenidas de pacientes y genéticamente caracterizadas como infectados por VPH31, VPH33 y VPH52, procedentes de la Unidad de Retrovirus y Papilomavirus del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Madrid).

##### 3.1.2. Muestras clínicas de estudio

Muestras de raspados anales obtenidas de una población de HSH infectados o no por VIH-1, que acudieron a una consulta de Enfermedades de Transmisión Sexual en Madrid (Centro Sanitario Sandoval), en un período comprendido entre el 1 de enero del año 2005 hasta el 31 de diciembre del año 2006. Las muestras fueron células epiteliales procedentes de la zona de transición escamo-columnar del canal anal y se recogieron empleando un dispositivo tipo cepillo (Qiagen, Alemania).



### 3.1.3. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las líneas celulares infectadas por VPH (células HeLa y SiHa) fue RPMI 1640 modificado (10mM HEPES, 1mM piruvato sódico, 2mM L-glutamina, 4.500mg glucosa/L, 1.500mg bicarbonato sódico/L) suplementado al 10% con suero bovino fetal (inactivado por calor), 50 U.I/ml de penicilina, 50 µg/ml estreptomicina y al 5% con L-Glutamina 100mM.

### 3.1.4. Cebadores sintéticos

Los cebadores sintéticos utilizados en las reacciones de PCR fueron sintetizados por la empresa Genosys (Sigma-Aldrich, EE.UU) y facilitados por la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Madrid).

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Crecimiento y conservación de las líneas celulares

Las dos líneas celulares se cultivaron utilizando cabinas de seguridad biológica de clase 2, manteniendo los cultivos a una temperatura de 37° C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Los pases celulares se realizaron cada 48 ó 72 horas hasta lograr una confluencia celular completa, aproximadamente una concentración celular de 10<sup>7</sup> células por ml de medio de cultivo. Los pases celulares se realizaron mediante la decantación del medio de cultivo y tratamiento con 5 ml tripsina-verseno (0,005%-0,05%) con el fin de disgregar la monocapa celular. Posteriormente las células se centrifugaron a 1.200 r.p.m durante 10 minutos con el fin de eliminar los restos de tripsina-verseno de las células, y se resuspendieron en el volumen adecuado de medio de cultivo.

La conservación de las células durante periodos de tiempo prolongados, se realizó mediante su almacenamiento en nitrógeno líquido (-196° C). Para ello se prepararon alícuotas de 10<sup>7</sup> células por ml en medio de congelación constituido por 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) en suero bovino fetal. Antes de almacenarse en nitrógeno líquido se mantuvieron durante 24 horas a -70° C.

### 3.2.2. Recogida y conservación de las muestras anales

Para la conservación y transporte de las muestras se empleó el medio recomendado para la prueba de captura de híbridos hc2 *High-Risk HPV DNA Test*® (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante que incluían un máximo de dos semanas a una

temperatura de entre 2 y 8° C (**Figura 3.2**). Las muestras fueron recogidas por los clínicos responsables de la clínica de ETS y codificadas con el fin de mantener la confidencialidad de los datos de los pacientes. Se trasladaron al Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Madrid) donde se llevó a cabo el análisis de la infección por VPH. La detección y el genotipado de VPH se realizó a partir de la misma toma de raspado anal.



**Figura 3.2.** Dispositivo de toma de muestra y medio de conservación y transporte de la prueba hc2. *High-Risk HPV DNA Test*®. (Cedido por Qiagen).

### **3.2.3. Detección de ADN de VPH de alto riesgo en las muestras anales mediante el método *High-Risk HPV DNA Test*®**

En todas las muestras se llevó a cabo la detección del ADN de VPH de alto riesgo empleando la prueba de captura de híbridos *High-Risk HPV DNA Test*® con la tecnología *Hybrid Capture*® 2 (hc2) (Qiagen, Alemania). La prueba está basada en la hibridación en solución de una mezcla de sondas ARN sintéticas complementarias a la secuencia específica de 13 tipos de VPH-AR: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.

En un primer paso, las muestras se incubaron durante 45 minutos a 65° C con una solución de desnaturalización proporcionada por la técnica (solución diluida de hidróxido de sodio), lo que permitió la lisis viral y la liberación del ADN. El volumen de solución de desnaturalización que se añadió a cada muestra fue la mitad del volumen de la misma, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después las muestras se sometieron a la hibridación con sondas ARN específicas para los VPH de alto riesgo dando lugar a la formación de híbridos de ARN-ADN, que fueron capturados por anticuerpos unidos a la fase sólida, capaces de reconocer los híbridos de manera específica. A continuación, los híbridos inmovilizados reaccionaron con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina específicos para los híbridos de ADN-ARN, y la reacción fue detectada mediante la adición de un sustrato quimioluminiscente y su detección empleando un luminómetro. Los resultados se expresaron como unidades de luz relativas (RLU), siendo proporcionales a la cantidad del ADN de VPH

presente en la muestra, lo que aporta una medida semicuantitativa de la carga viral (**Figura 3.3**). El valor de corte a partir del cual se estableció un resultado como positivo fue de 1.0 RLU (equivalente a 1.0 pg de ADN de VPH por 1.0 ml de muestra).

El límite de detección de este ensayo es de 1 pg/ml de muestra lo que equivale, según las instrucciones del fabricante, a 100.000 copias de VPH/ml de muestra.



**Figura 3.3.** Esquema de detección de VPH-AR empleando el test *hc2 High-Risk HPV DNA* con la tecnología *Hybrid Capture® 2*. (Cedido por Qiagen).

#### 3.2.4. Extracción de ADN de las muestras anales y de las líneas celulares

La obtención del ADN genómico de las muestras anales se llevó a cabo empleando un extractor automático: BioRobot M48 (Qiagen, Alemania). El principio que rige el sistema extractor está fundamentado en la unión de los ácidos nucleicos a la superficie de sílice de partículas magnéticas en presencia de sales caotrópicas (**Figura 3.4**).

La extracción del ADN para el genotipado y la caracterización de las variantes de VPH, se hizo empleando un protocolo recomendado por el fabricante a partir de un volumen de muestra de 100 µl. Las muestras se trataron empleando un tampón de lisis y unión que contiene tiocianato de guanidina y dos tampones de lavado, uno de ellos (tampón de lavado-1) que contiene hidrocloreto de guanidina y etanol. El ADN se eluyó en un tampón proporcionado por el método en un volumen final de 50 µl y se almacenó a -80° C hasta su utilización. Todos los componentes de los protocolos de extracción son propiedad de Qiagen, de manera que el acceso a las composiciones está restringido.



La extracción del ADN genómico de las líneas celulares se llevó a cabo a partir de sedimentos celulares secos (aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células) conservados a  $-20^\circ \text{C}$ . Para su procesamiento en el extractor de ADN automático, éstos fueron previamente resuspendidos en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffer Saline*). El protocolo de trabajo utilizado fue el mismo empleado en el procesamiento de las muestras anales. El ADN se eluyó en 50  $\mu\text{l}$  de tampón de elución de Qiagen.

El empleo de un extractor automático, minimizó el riesgo de contaminación entre las muestras.

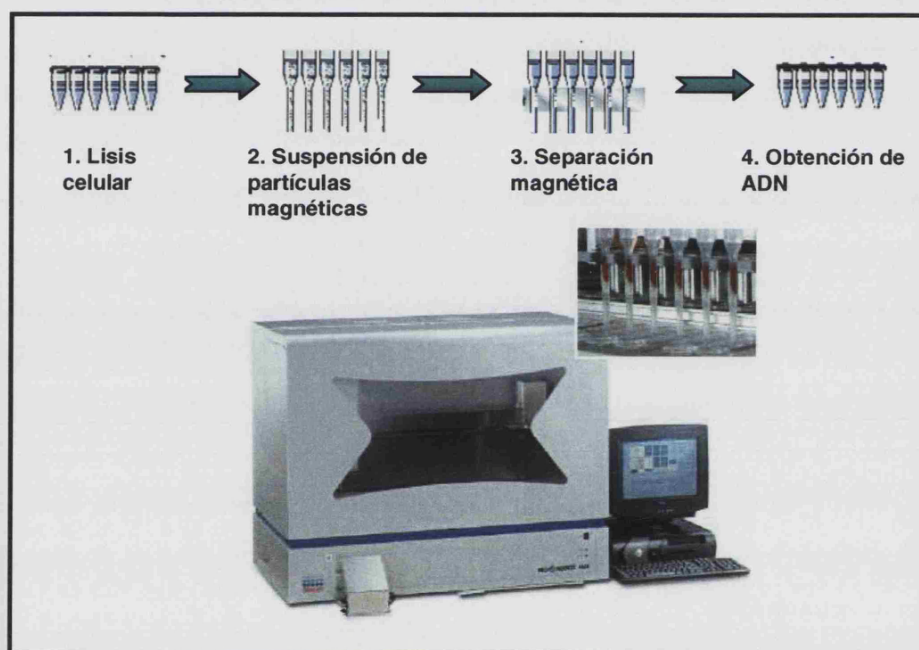


Figura 3.4. Esquema del proceso de extracción de ADN y extractor automático BioRobot M48. (Modificado de Qiagen).

### 3.2.5. Medida de la concentración de ácidos nucleicos de los controles de laboratorio mediante espectrofotometría

Las concentraciones de ADN de las líneas celulares y las muestras clínicas empleadas como control de laboratorio, fueron determinadas midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, EE.UU).

La lectura de absorbancia se estableció como válida si oscilaba entre los rangos de 0.1-1.0, siendo  $A_{260} = 1,0$  para una concentración de ADN igual a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de muestra. La pureza del ADN se determinó calculando la razón de los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Cuando el valor de dicho cociente estuvo comprendido entre 1,7-1,9 el ADN se consideró válido para su estudio.

De esta forma la concentración del ADN se estableció utilizando la fórmula:

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times D \times 50 \mu\text{g/ml} \quad \text{siendo, } D = \text{factor de dilución}$$

La concentración de ADN se ajustó, en el caso de los controles realizados a partir de las líneas celulares Hela y SiHa, a 10,5 ng/μl; la concentración de ADN obtenida a partir de las muestras clínicas fue ajustada a 1 ng/μl.

### 3.2.6. Genotipado de VPH mediante *Linear Array HPV Genotyping® Test*

En todas las muestras positivas en la prueba *hc2 High-Risk HPV DNA Test®*, los genotipos presentes en cada una de ellas fueron detectados empleando la metodología *Linear Array® HPV Genotyping test* (Roche Molecular Systems, EE.UU), una versión comercializada y mejorada del ensayo line blot PGMY (PGMY-LB) (Coutlee *et al.*, 2002, 2006). La prueba emplea los cebadores PGMY biotinilados, diseñados para amplificar un fragmento de 450 pb de la región polimórfica que codifica la proteína L1 en el genoma de VPH. El grupo de cebadores consenso PGMY09/11 (Gravitt *et al.*, 2000) empleados en este ensayo están diseñados para amplificar ADN de VPH de 37 genotipos (VPH6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 y CP6108). La prueba incluye un par de cebadores del gen de la β-globina humana que proporciona un control para una extracción de ácidos nucleicos y una amplificación adecuadas.

La prueba está basada en cuatro procesos: preparación de las muestras, amplificación mediante PCR, hibridación de los productos amplificados con sondas oligonucleótidas y detección de los productos amplificados fijados a las sondas mediante determinación colorimétrica. La preparación de la muestra, según las instrucciones del fabricante, se realiza liberando el ADN de VPH mediante la lisis de las células bajo condiciones de desnaturalización a elevadas temperaturas en presencia de la proteinasa K, un agente caotrópico y un detergente. A continuación se procede al aislamiento y purificación del ADN en una columna, y a la elución con un reactivo proporcionado por la prueba. El gen de la β-globina humana se aísla de forma simultánea. Este paso fue sustituido por la extracción del ADN en el extractor automático descrito en el apartado 3.2.4. La amplificación empleó los cebadores biotinilados incluidos en la mezcla de reacción, incluyéndose los cebadores adicionales para el gen de la β-globina humana. Tras la amplificación, se realizó la hibridación de cada muestra con una tira de genotipado

revestida con las sondas de los distintos tipos de VPH y sondas de  $\beta$ -globina. El producto amplificado y marcado con biotina hibridará con alguna de las sondas sólo si contenía la secuencia correspondiente de la sonda complementaria. Por último, se realizó la detección empleando un conjugado de estreptavidina y peroxidasa, que se unió al producto amplificado marcado con biotina e hibridado con las sondas específicas de los tipos de VPH. Se reveló con una solución substrato que contenía peróxido de oxígeno y 3, 3',5, 5'-tetrametilbencidina (TMB), que viró a color azul sobre las posiciones correspondientes a cada una de las sondas específicas de los diferentes tipos de VPH inmovilizadas en la tira de nitrocelulosa. La lectura del ensayo se realizó visualizando las reacciones de hibridación empleando una guía de referencia proporcionada por la prueba.

Las muestras fueron clasificadas como válidas si los resultados de la prueba fueron positivos para VPH,  $\beta$ -globina o ambos (Figura 3.5).

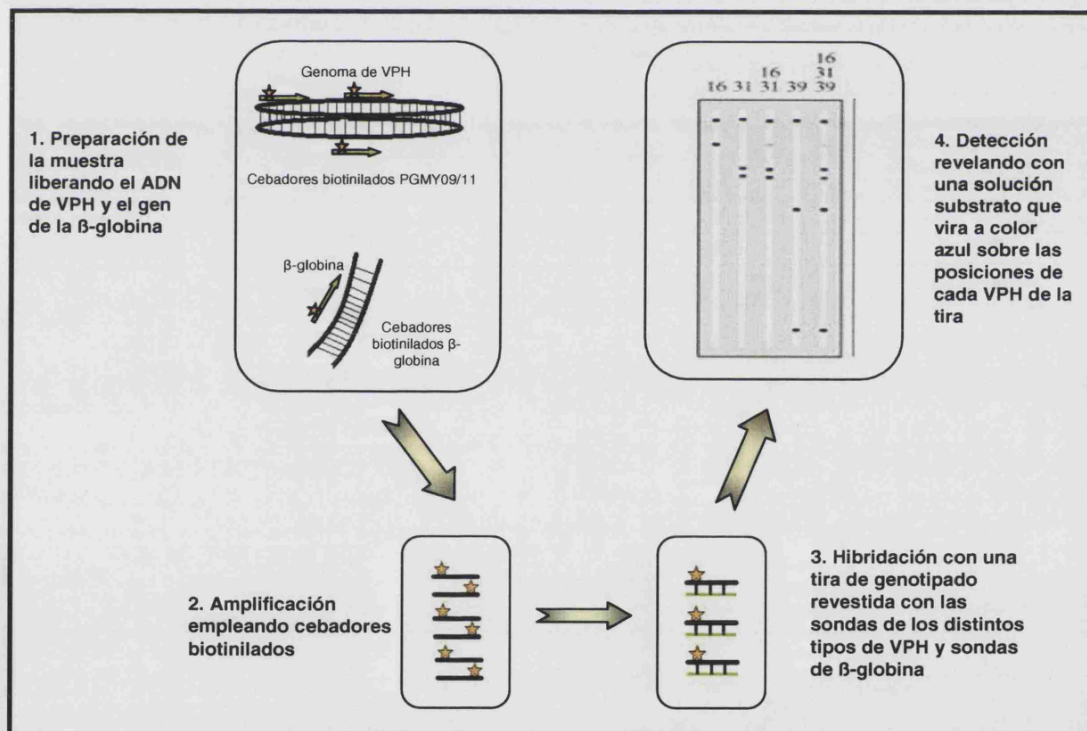


Figura 3.5. Esquema de detección de los tipos de VPH-AR empleando el test *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup>. (Autor, Montserrat Torres).

### 3.2.7. Amplificación del ADN de VPH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la caracterización de variantes

La amplificación de ADN de VPH se llevó a cabo en las muestras caracterizadas mediante la prueba *Linear Array*<sup>®</sup> *HPV Genotyping test* (Roche Molecular Systems, EE.UU) como VPH16, 18, 31, 33 y 52 en tres regiones del genoma viral: las regiones codificantes de

las proteínas virales oncogénicas E6 y E7, y una parte de la región reguladora o región no codificante.

Se emplearon cebadores específicos de la región y del tipo de papiloma a estudiar descritos en la bibliografía o diseñados empleando el programa PrimerSelect incluido en el paquete informático Lasergene (DNASTar, EE.UU). Los cebadores fueron diseñados de modo que en las regiones codificantes de las oncoproteínas se amplificaron la secuencia completa de los genes, y en la región reguladora una región variable desde 362 pb en VPH18 hasta 541 pb en VPH33. Estas secuencias correspondían al segmento central de la región reguladora, que incluye el potenciador específico de tejido con sitios de unión a numerosos activadores y represores de la transcripción (**Tablas 3.1, 3.2 y 3.3**). Las posiciones de cada cebador en las diferentes regiones del genoma viral se esquematizan en la **figura 3.5**.

**Tabla 3.1.** Cebadores empleados en la amplificación de VPH16, 18, 31, 33, y 52 para el análisis de polimorfismos en la región codificante de la proteína E6.

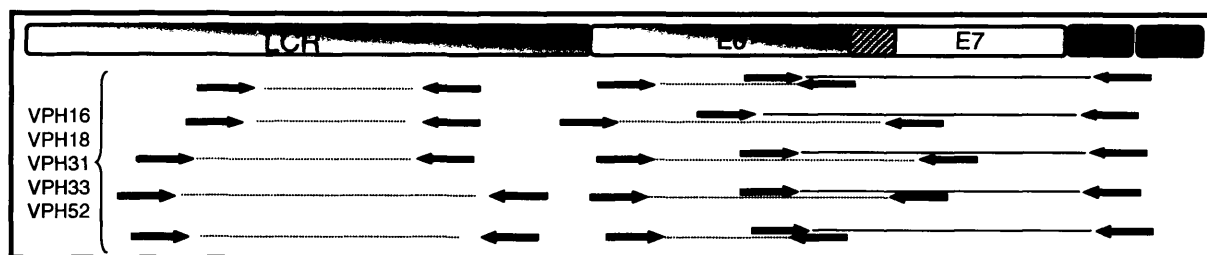
Genotipo	Nombre	Posición nucleotídica	Tamaño amplicón (pb)	Secuencia 5'-3'	Referencia bibliográfica
VPH 16	E616F	52-69	523	CGAAACCGGTTAGTATAA	Diseño propio
VPH 16	E616R	558-575		GTATCTCCATGCATGATT	
VPH 18	E618F	7819-7840	620	GCAACCGAAATAGGTTGGGCAG	Pista <i>et al</i> ; 2007
VPH 18	E618R	558-581		TTATACTTGTT-TCTCTG-CGTCC	
VPH 31	E631F	40-57	640	CGAAAGTGGTGAACCGAA	Gagnon <i>et al.</i> , 2005
VPH 31	E631R	659-680		GACTGTCTATGACATCCTCCTC	
VPH 33	E633F	35-54	561	TGTAACCGAAAGCGGTTCAA	Gagnon <i>et al.</i> , 2004
VPH 33	E633R	575-596		TAACGTTGGCTTGTGTCCTCTC	
VPH 52	E652F	76-98	480	GAACACAGTGTAGCTAACGCACG	Aho <i>et al.</i> , 2004
VPH 52	E652R	535-556		GCATGACGTTACACTTGGGTCA	

**Tabla 3.2.** Cebadores empleados en la amplificación de VPH16, 18, 31, 33, y 52 para el análisis de polimorfismos en la región codificante de la proteína E7.

Genotipo	Nombre	Posición nucleotídica	Tamaño amplicón (pb)	Secuencia 5' - 3'	Referencia bibliográfica
VPH 16	E716F	500-522	490	ACCGGTCGATGTATGTCTTGTG	Diseño propio
VPH 16	E716R	967-990		ACTGTCATTTTCGTTCTCGTCATC	
VPH 18	E718F	425-446	507	GTGCCAGAAACCGTTGAATCCA	Diseño propio
VPH 18	E718R	949-932		CGTGCCCTCCCCGTCTGT	
VPH 31	E731F	510-529	541	CGTTGCATAGCATGTTGGAG	Gagnon <i>et al.</i> , 2005
VPH 31	E731R	1032-1051		CTGCTTCTGCCTGATTGTTG	
VPH 33	E733F	529-548	411	AGGTCCCGACGTAGAGAAAC	Gagnon <i>et al.</i> , 2004
VPH 33	E733R	920-940		TCTACCTCAAACCAACCAGTA	
VPH 52	E752F	481-500	499	ATATTATGGGTCGTTGGACA	Aho <i>et al.</i> , 2004
VPH 52	E752R	901-980		TTCAAACCAGCCTGTACATC	

**Tabla 3.3.** Cebadores empleados en la amplificación de VPH16, 18, 31, 33, y 52 para el análisis de polimorfismos en la región reguladora.

Genotipo	Nombre	Posición nucleotídica	Tamaño amplicón (pb)	Secuencia 5' - 3'	Referencia bibliográfica
VPH 16	LCR16F	7477-7458	384	GGGGTACCTCGGTTGCATGCTTTTGGC	Calleja-Macias <i>et al.</i> , 2004
VPH 16	LCR16R	7861-7842		GGTCTAGACGGTTTGCACACACCCATGT	
VPH 18	LCR18F	7463-7484	362	TTTCGGTTCCTTT-GGCTTA-TG	Pista <i>et al.</i> , 2007
VPH 18	LCR18R	7809-7825		CGGTTGCATAAACTATGTAT	
VPH 31	LCR31F	7381-7403	433	TTAGGTGTCACGCCATAGTAAAA	Gagnon <i>et al.</i> , 2005
VPH 31	LCR31R	7795-7814		CATGACACAACCTTGGCAGT	
VPH 33	LCR33F	7337-7354	541	TGGGTGTACCTATATGAG	Gagnon <i>et al.</i> , 2004
VPH 33	LCR33R	7861-7878		GACCTAAAACGGTTAGTC	
VPH 52	LCR52F	7393-7412	499	TTGCACCCACATGAGTAACA	Aho <i>et al.</i> , 2004
VPH 52	LCR52R	7873-7892		AGTGCACACCTGGTGAGTAA	

**Figura 3.5** Cebadores de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33 y VPH52. Esquema de las posiciones de los cebadores empleados en la detección de los polimorfismos de la región reguladora, y las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7. (Autor, Montserrat Torres).



Para llevar a cabo la puesta a punto y evaluación de las reacciones y condiciones de la amplificación empleadas en cada uno de los tipos de papiloma estudiados, se empleó un *pool* de ADN de VPH de los tipos: VPH16, VPH18, VPH31, VPH33 y VPH52 obtenido a partir de las líneas celulares y las muestras clínicas.

Las reacciones de amplificación de cada uno de los tipos de VPH estudiados se realizaron por separado empleando un termociclador 9700 (Applied Biosystems™, EE.UU), en tubos de 0,2 ml en un volumen final de 50 µl conteniendo 49 µl de mezcla de reacción y 1 µl del ADN extraído de cada una de las muestras (10-50 ng). La mezcla incluía 25 µl de 2X iQ™ Supermix (Bio-Rad, EE.UU) que contiene la enzima *hot-start* iTaq™ DNA polimerasa 50U/ml, 100mM KCl, 40mM Tris-HCl, pH 8.4; 0,4mM de cada dNTP, 6mM MgCl<sub>2</sub>; 15 pmoles de cada uno de los cebadores y agua destilada hasta completar el volumen final.

Las condiciones de amplificación que se emplearon variaron dependiendo del tipo de VPH amplificado y de la región analizada: paso inicial de desnaturalización y activación de la enzima a 96°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos (s) a 94 °C, 30 s a temperaturas que variaron desde 55°C en la región reguladora para los tipos 18, 31, 33, 52 y en la región codificante de E7 en VPH16, una temperatura de 60°C en la región codificante de E6 para los tipos 18, 31, 33, 52, una temperatura de 58°C en la región codificante de E7 en VPH18, y una temperatura de 63°C en la región codificante de E7 en los tipos virales 31,33, 52; y un paso final de extensión durante un minuto a 72°C en todos los casos. Estas condiciones fueron usadas para todas las amplificaciones con la excepción de VPH16 en la región reguladora que incluyó: 94°C durante 4 minutos, 40 ciclos de 15 s a 94°C, 1 minuto y 30 s a 68°C y un paso final de extensión durante 1 minuto a 72°C. En todas las reacciones de PCR, se incorporó un tubo de control de contaminación, al que no se añadía ADN. Los productos de PCR fueron conservados a 4°C hasta su utilización.

### 3.2.8. Electroforesis en geles de agarosa

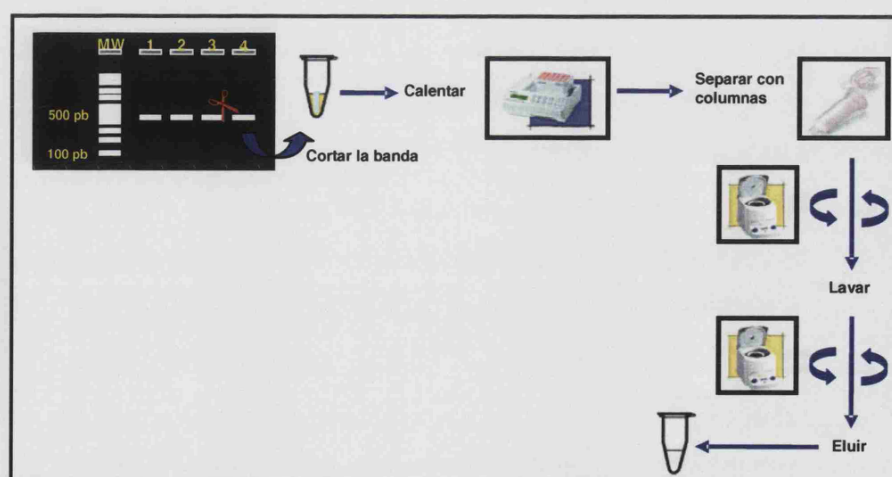
La identificación de los productos de PCR para cada tipo en cada una de las regiones, se realizó en geles de agarosa D-1 (Pronadisa, España) al 2%. La suspensión se preparó en tampón TAE 1X (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8) y tinción con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Como tampón de carga se utilizó una solución comercial (Fermentas, EE.UU) compuesta por: Tris-HCl 10mM (pH 7,6); azul de bromofenol al 0,03% (v/v); xilencianol FF al 0,03% (v/v); glicerol al 60% (v/v) y EDTA 60mM. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación utilizando un marcador de peso molecular conocido de 100 pb (ADN del fago λ digerido con varias enzimas de restricción; *GenRuler*™

DNA Ladder Plus, Fermentas, EE.UU) que genera un patrón de 14 bandas y que es el recomendado para la cuantificación de fragmentos de ADN de pequeño tamaño. El sistema de electroforesis fue una cubeta horizontal Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, EE.UU) con un voltaje de 90 a 100 V, durante 30 minutos, empleando tampón TAE 1X. Los geles se visualizaron en un transiluminador mediante exposición de luz ultravioleta y fueron fotografiados con un video-impresor acoplado a la estación de trabajo *Gelprinter Super II*, (TDI, España).

### 3.2.9. Purificación de los productos amplificados

#### 3.2.9.1. Purificación mediante geles de agarosa

Cuando se observaron bandas minoritarias de amplificación inespecíficas, se empleó para la purificación el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Alemania) diseñado para extraer y purificar fragmentos de ADN de entre 70 pb y 10 Kpb en geles de agarosa. Las bandas de interés (identificadas por su tamaño cuando los geles se observaban bajo luz ultravioleta) se cortaron mediante la utilización de bisturí, y a continuación se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las muestras se eluyeron en un volumen final de 50 µl H<sub>2</sub>O destilada estéril y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior utilización. Esta purificación se realizó en la región codificante de la proteína E6 en seis muestras infectadas por VPH33 y 11 muestras infectadas por VPH52; en la región codificante de la proteína E7 en siete muestras infectadas por VPH16 y en diez muestras infectadas por VPH52; y en la región reguladora se purificó mediante gel de agarosa en diez muestras infectadas por VPH31 y en siete muestras infectas por VPH52 (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6.** Esquema de la purificación del ADN empleando la metodología de geles de agarosa. (Autor, Dra. Marta Ortiz).

### 3.2.9.2. Purificación mediante columnas

El ADN amplificado fue purificado utilizando *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, Alemania) cuando se visualizó una única banda específica en el gel. Este método está basado en la adsorción de ácidos nucleicos a superficies de silica-gel que ocurre en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas (Vogelstein *et al.*, 1979). El protocolo se realizó según las recomendaciones fabricante y el ADN se eluyó en 50 µl H<sub>2</sub>O destilada estéril.

### **3.2.10. Cuantificación de los productos amplificados**

La cantidad y calidad de los productos obtenidos, se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa utilizando un marcador de peso molecular 100 pb (*GenRuler™ DNA Ladder Plus*, Fermentas, EE.UU). Los ADN purificados se mantuvieron a -20°C hasta su posterior utilización.

### **3.2.11. Secuenciación**

El método empleado para la secuenciación fue el de los terminadores de cadena (Sanger, 1981), basado en la utilización de ddNTPs. Se realizó la reacción de secuenciación (cíclica), utilizando el marcaje fluorescente comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems™, EE.UU) empleando el protocolo recomendado por el fabricante, utilizando los productos purificados para cada una de las regiones de cada uno de los tipos virales. Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación fueron los mismos que se emplearon en las reacciones de amplificación a una concentración de 3,2 pmoles/µl. La cantidad de ADN purificado utilizado para secuenciar cada una de las muestras se fijó en 20 ng por cada 100 pb y se realizaron dos reacciones de secuenciación independientes empleando los oligonucleótidos de la reacción de amplificación, de forma que se obtuvo una lectura en ambos sentidos de una parte de la región reguladora o del gen completo en el caso de las proteínas oncogénicas.

Los ciclos de la reacción de secuenciación variaron según el tipo viral y la región a secuenciar: 94°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos de 10 s a una temperatura de 96°C; 5 s a diferentes temperaturas (en la región reguladora 50°C en los tipos 18, 31, 33, 52 y en la región codificante de la proteína E7 en el tipo 16; en la región codificante de la proteína E6 en VPH18, 31, 33, 52 una temperatura de 55°C; y en la región codificante de la proteína E7 en VPH18 53°C y en VPH31, 33, 52 a 58°C) y un paso final de 4 minutos a 60°C. Para la región reguladora y la región codificante de la proteína E6 del tipo 16: 94°C durante 3 minutos, 25 ciclos de 10 segundos 96°C, 5 segundos a 63°C y 4 minutos a 60°C (Tabla 3.4).

Las muestras ya amplificadas se remitieron a la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Madrid), para su purificación y electroforesis. La lectura de cada secuencia se realizó en un secuenciador ABI PRISM 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems, EE.UU).

**Tabla 3.4.** Esquema de las temperaturas de hibridación empleadas en las reacciones de secuenciación de VPH16, 18, 31, 33, y 52 en cada una de las regiones analizadas.

Genotipo	Región	Temperatura °C
VPH 16	E6	50
VPH 18, VPH 31, VPH 33, VPH 52	E6	55
VPH 16	E7	50
VPH 18	E7	53
VPH 31, VPH 33, VPH 52	E7	58
VPH 16	LCR	63
VPH 18, VPH 31, VPH 33, VPH 52	LCR	50

### 3.2.12. Edición y análisis de secuencias

Las secuencias fueron visualizadas y analizadas empleando los paquetes informáticos Chromas versión 1.55 (Helensvale, Australia) y Lasergene (DNASTar, EE.UU). Las comparaciones de secuencia se llevaron a cabo con el programa de alineamiento local BLAST (NCBI, EE.UU).

### 3.2.13. Análisis filogenético

El análisis filogenético de las secuencias correspondientes a cada uno de los genotipos de VPH en las diferentes regiones analizadas, requirió como paso previo el alineamiento múltiple de las secuencias problema con muestras de referencia tomadas de la base de datos del GenBank (NCBI, EE.UU). En el caso de los genotipos de VPH en los que hay definidas ramas filogenéticas en base a los estudios previos que correlacionan el origen geográfico de las variantes de VPH y la topografía de la filogenia resultante (Burk, 2003), se utilizaron secuencias de referencia de cada una de las ramas descritas (Tabla 3.5). Así en VPH16, se utilizaron secuencias de referencia de las ramas: Europea, Asiática, Asiática-América, Africana tipo 1 y Africana tipo 2; y en VPH18 de las ramas: Europea, Asiático-América y Africana. En los genotipos de VPH en los que no existen establecidas ramas filogenéticas, el análisis filogenético se realizó utilizando como referencia las secuencias prototipo.

Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando el programa MegAlign del paquete informático Lasergene (DNASTar, EE.UU) y el programa Clustal W1.8 (Thompson *et*

*al.*, 1994), aunque fueron definidas con intervención manual. El análisis filogenético se realizó empleando los métodos UPGMA y Máxima Verosimilitud utilizando el paquete informático TreeCon (Van de Peer *et al.*, 1993); se analizaron 1.000 réplicas y los árboles se editaron empleando el mismo programa.

**Tabla 3.5.** Número de acceso de la base de datos GenBank (NCBI, EE.UU) de las secuencias de referencia de los tipos de VPH empleadas en este trabajo.

Genotipo	Rama/Clase	Número acceso
VPH 16	Europea/E-350T	K02718
VPH 16	Europea/E-350G	AF536179
VPH 16	Asiático-Americana	AF402678
VPH 16	Africana tipo 2	AF472509
VPH 18	Asiático-Amerindia	AY262282
VPH 18	Europea	EF202147
VPH 18	Africana	EF202152
VPH 31	Referencia o prototipo	J04353
VPH 33	Referencia o prototipo	M12732
VPH 52	Referencia o prototipo	X74481

### 3.2.14. Asignación de variantes

La caracterización de las variantes moleculares se hizo de forma independiente, de manera que las divergencias en las secuencias de cada aislado con respecto a las secuencias de referencia de cada tipo nos permitieron identificarlas. En algunos casos, las variaciones detectadas en las secuencias estudiadas con respecto a la secuencia de referencia pertenecían a variantes moleculares que ya habían sido descritas; en los casos en los que los cambios localizados no pertenecían a patrones conocidos, las secuencias se clasificaron de acuerdo con su grado de similitud con los descritos y fueron caracterizadas como variantes nuevas. En este último caso, las muestras fueron confirmadas por duplicado repitiendo la amplificación y el análisis de la secuencia, para evitar variaciones de nucleótidos derivadas de errores de la enzima Taq polimerasa.

En los genotipos de VPH16 y VPH18, en los cuales hay definidas ramas filogenéticas, el análisis de polimorfismos genéticos se realizó mediante la descripción de los diferentes patrones identificados en cada una de ellas. En la región codificante de E6, en la que se han descrito clases dentro de cada rama filogenética, las variantes de VPH16 se clasificaron en rama y clase. Sin embargo, en los genotipos de VPH en los que no hay definidas ramas filogenéticas, las variantes detectadas fueron agrupadas en dos categorías más amplias,

prototipo y no prototipo (aquellas con una secuencia de ADN divergente a la secuencia de referencia).

### **3.2.15. Predicción de los posibles efectos de las mutaciones puntuales en la región reguladora**

En la región reguladora, se ha descrito que determinadas mutaciones puntuales dan lugar a pérdida o ganancia de sitios de unión de diferentes proteínas celulares o factores de transcripción. Para predecir el posible efecto de las mutaciones nuevas descritas en dicha región, se empleó el programa informático TFSEARCH (Heinemeyer *et al.*, 1998).

### **3.2.16. Análisis estadístico**

Las características sociodemográficas analizadas de los pacientes que participaron en el estudio fueron la edad y el origen geográfico, y las características clínicas fueron la presencia o no de infección por VIH-1. En ambos casos, los datos fueron amablemente cedidos por el Centro Sanitario Sandoval (Madrid). Se realizó un análisis descriptivo de las variables utilizadas para caracterizar la población de estudio utilizando una distribución de frecuencias para variables categóricas y medias con desviación estándar para variables continuas. Se modelizaron las variables continuas como categóricas para permitir una mayor flexibilidad en la forma de su relación con el logaritmo de la *odds* de infección por VPH-AR. Además se recodificaron algunas variables categóricas para aumentar la muestra en los grupos y poder estudiar la relación con las variables respuesta de una manera más eficaz. Se calcularon las razones de riesgo (OR, *Odds Ratios*) e intervalos de confianza al 95% (IC95%) para investigar y cuantificar la asociación entre cada factor de riesgo potencial y la infección por el VPH-AR. Además de la regresión logística para valorar asociaciones con la infección por el VPH-AR, paralelamente se realizaron otras dos regresiones logísticas, donde la variable respuesta por un lado fue la presencia de la variante Europea *vs.* variante no Europea en las muestras de pacientes infectados por VPH16 y VPH18, y por otro lado la presencia de variante prototipo *vs.* variante no prototipo en las muestras de pacientes infectados por VPH31, 33 y 52. En ambos casos, se calcularon también OR e IC95% para observar la relación entre las variables del estudio y las variables respuesta.

En el análisis univariado realizado para estudiar las posibles diferencias entre las variables sociodemográficas y clínicas y las diferentes variables respuesta, se usó el test de t-student para datos continuos con distribución normal, el test de Mann-Whitney para datos no paramétricos, el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para frecuencias y para calcular el p valor de

tendencia se usó el test  $\chi^2$  y el de Fisher. Todos los análisis se muestran estratificados por la variable “estatus VIH-1” de acuerdo a los objetivos planteados en esta tesis doctoral. Para todos los análisis se utilizaron los paquetes estadísticos Epi Info 3 (versión 3.3.2, 1995, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, EE.UU), SPSS v. 18 (IBM, EE.UU) y Stata 11 (StataCorp LP, EE.UU).







## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Durante el período de estudio (2005-2006) se reclutaron 401 HSH, a los cuales se les realizó una toma de cepillado anal para la detección de la infección por VPH-AR. Las características de la población estudiada se muestran en la **tabla 4.1**. De acuerdo al estatus VIH-1 de los pacientes, 233 hombres no estaban infectados por VIH-1 (58,1%), 143 hombres estaban infectados por VIH-1 (35,7%) y en 25 hombres se desconocía su estatus frente a la infección por VIH-1 (6,2%). La población española fue mayoritaria (64,8%), seguida por la procedente de países latinoamericanos (26,2%). La edad de los pacientes estaba comprendida desde los 14 hasta 60 años (edad media 32 años  $\pm$  8,38). En cuatro casos (1%) no se dispuso de datos de edad, aunque los pacientes no fueron excluidos del estudio. Para el análisis de resultados, la variable edad se estratificó en cuatro grupos, menores de 30 años (47,4%), entre 30 y 40 (37,9%), entre 41 y 50 (11%) y mayores de 50 años (2,7%). En la distribución de los pacientes de acuerdo con la edad, se observó que en los hombres no infectados por VIH-1 y en aquellos con estatus VIH-1 desconocido, el mayor porcentaje correspondía a los pacientes menores de 30 años (54,9% y 52%, respectivamente); mientras que en los pacientes infectados por VIH-1 el grupo mayoritario era el que presentaba una edad entre 30-40 años (49%).

**Tabla 4.1** Características sociodemográficas de los 401 HSH participantes en el estudio estratificadas por el estatus VIH-1.

	Negativo		Estatus VIH-1 Positivo		Desconocido		Total	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
	233	58,1	143	35,7	25	6,2	401	100
<b>Origen geográfico</b>								
España	153	(65,7)	90	(62,9)	17	(68)	260	(64,8)
Latinoamérica	62	(26,6)	39	(27,3)	4	(16)	105	(26,2)
Otros	18	(7,7)	14	(9,8)	4	(16)	36	(9)
<b>Edad</b>								
<30	128	(54,9)	49	(34,3)	13	(52)	190	(47,4)
30-40	72	(30,9)	70	(49)	10	(40)	152	(37,9)
41-50	23	(9,9)	21	(14,7)	-	-	44	(11)
>50	8	(3,4)	2	(1,4)	1	(4)	11	(2,7)
Desconocido	2	(0,9)	1	(0,7)	1	(4)	4	(1)

### 4.2. PREVALENCIA DE VPH-AR Y DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS

La prevalencia de VPH-AR obtenida mediante la metodología de captura de híbridos en los 401 hombres analizados fue del 54,9%. Como se muestra en la **tabla 4.2**, cuando los resultados se estratificaron por estatus VIH-1, se observó una prevalencia significativamente mayor en los hombres infectados por VIH-1 frente a los no infectados (74,8% *vs.* 43,3%;

$p < 0,001$ ). En el análisis univariado se observó que estar infectado por VIH-1 estaba asociado con una prevalencia de VPH-AR cuatro veces mayor (OR 3,9; IC95%:2,5-6,1).

**Tabla 4.2.** Prevalencia de la infección de VPH-AR en los pacientes incluidos en el estudio de acuerdo con el estatus VIH-1.

	N 401	Prevalencia VPH-AR (%)	p-valor	OR (IC95%) univariado	p-valor
<b>Estatus VIH-1</b>					
Negativo	233	101 (43,3)	< 0,001	1	< 0,001
Positivo	143	107 (74,8)		3,9 (2,5; 6,1)	
Desconocido	25	12 (48)		1,2 (0,5;2,8)	

En la **tabla 4.3** se muestran los resultados del análisis univariado de la prevalencia de infección de VPH-AR según el origen geográfico y la edad de los pacientes, estratificado por la variable estatus VIH-1. En los pacientes no infectados por VIH-1 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de infección en función del origen geográfico ni la edad de los pacientes. Sin embargo, en la población infectada por VIH-1 si se observaron diferencias estadísticamente significativas en base al origen geográfico ( $p < 0,001$ ). De esta forma, en los hombres latinoamericanos la prevalencia de infección por VPH-AR es del 92,3%, significativamente mayor que la observada en los hombres españoles (72,2%) y en los hombres procedentes de otros países (42,9%). En los pacientes infectados por VIH-1, proceder de un país latinoamericano estaba asociado con una prevalencia de VPH-AR entre cuatro y cinco veces mayor (OR 4,6; IC95%:1,3-16,4). Para la variable edad, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el estatus VIH-1 de los pacientes.

**Tabla 4.3.** Prevalencia de la infección de VPH-AR por origen geográfico y edad de acuerdo con el estatus VIH-1.

	Estatus VIH-1							
	Negativo				Positivo			
	Pv				Pv			
	N (%)	p-valor	OR(IC95%)	p-valor	N (%)	p-valor	OR(IC95%)	p-valor
<b>Origen geográfico</b>								
España	71 (46,4)	0,274	1	0,026	65 (72,2)	0,001	1	0,001
Latinoamericano	25 (40,3)		0,78 (0,4;1,4)		36 (92,3)		4,6 (1,3;16,4)	
Otros	5 (27,8)		0,44 (0,2;1,3)		6 (42,9)		0,3 (0,1;0,9)	
<b>Edad</b>								
<30	60 (46,9)	0,398	1	0,336	36 (73,5)	0,162	1	0,899
30-40	29 (40,3)		0,8 (0,4;1,4)		54 (77,1)		1,2 (0,5;2,8)	
41-50	10 (43,5)		0,9 (0,4;2,1)		16 (76,2)		1,2 (0,4;3,8)	
>50	1 (12,5)		0,2 (0;1,4)		0 (0)		-	
Desconocido	1 (50,0)		1,1 (0,1;18,5)		1 (100)		-	
Pv, Prevalencia								

Pv, Prevalencia

En las 220 muestras positivas a VPH-AR mediante la metodología de captura de híbridos se determinó el genotipo viral utilizando la tecnología *Linear Array® HPV Genotyping test*. La prevalencia tipo específica en la población estudiada se muestra en la **tabla 4.4**.

**Tabla 4.4.** Prevalencia de genotipos de VPH en 401 HSH de acuerdo con el status VIH-1 empleando la metodología *Linear Array Genotyping® Test*.

	Negativo N = 233	Estatus VIH-1 Positivo N = 143	Desconocido N = 25	Total (ºº) N = 401
<b>Genotipo VPH</b>				
<b>Alto Riesgo</b>				
VPH16	37	47	4	88 (21,9)
VPH18	22	24	2	48 (12,1)
VPH51	18	22	2	42 (10,6)
VPH68	9	27	4	40 (10,1)
VPH45	21	16	2	39 (9,9)
VPH58	15	23	1	39 (9,9)
VPH59	14	22	2	38 (9,6)
VPH39	17	19	1	37 (9,4)
VPH56	10	21	3	34 (8,6)
VPH31	11	16	2	29 (7,3)
VPH52	8	16	1	25 (6,3)
VPH35	10	11	3	24 (6,1)
VPH33	9	13	-	22 (5,6)
<b>Probable Alto Riesgo</b>				
VPH53	14	35	6	55 (13,9)
VPH66	9	20	2	31 (7,8)
VPH73	5	20	3	28 (7,1)
VPH26	2	7	1	10 (2,5)
VPH82	2	6	-	8 (2)
<b>Bajo Riesgo</b>				
VPH6	33	33	6	72 (18,2)
VPH72	4	34	1	39 (9,9)
VPH11	15	21	2	38 (9,6)
VPH61	10	23	1	34 (8,6)
VPH42	12	17	2	31 (7,8)
VPH54	9	20	1	30 (7,6)
VPH70	12	15	-	27 (6,8)
VPH40	9	7	1	17 (4,3)
VPH81	4	11	-	15 (3,8)
<b>Indeterminado</b>				
VPH84	14	33	6	53 (13,4)
CP6108	20	26	3	49 (12,4)
VPH62	12	25	-	37 (9,4)
VPH55	9	25	1	35 (8,7)
VPH83	4	10	3	17 (4,3)
VPH69	5	5	-	10 (2,5)
IS39	7	3	-	10 (2,5)
VPH71	1	4	-	5 (1,3)
VPH67	2	1	-	3 (0,8)

Se obtuvo un resultado válido en 212 muestras (96,4%). Las ocho muestras restantes fueron consideradas falsos positivos ya que en seis casos el resultado no fue válido al

obtenerse un resultado negativo para la amplificación del gen de la  $\beta$ -globina humana; y en dos casos porque no se detectó ningún genotipo de VPH. Estos casos correspondían a dos pacientes infectados por VIH-1, y seis pacientes no infectados por VIH-1.

En las muestras analizadas se identificaron 36 tipos y su potencial oncogénico fue establecido de acuerdo con la clasificación epidemiológica descrita en el año 2006 por Muñoz *et al.* La única excepción fue el tipo 68, que se clasificó como tipo de AR porque se incluye en la sonda empleada en la técnica de captura de híbridos. De esta forma, en el total de muestras estudiadas se describieron trece tipos de alto riesgo oncogénico, seis de probable alto riesgo, nueve de riesgo indeterminado y nueve genotipos de bajo riesgo. En siete muestras de las 212 (3,3%) en las que se obtuvo un resultado válido de genotipado de VPH, no se detectó ningún genotipo de AR oncogénico de los que es capaz de detectar la tecnología de captura de híbridos y fueron considerados por tanto como falsos positivos. En el resto se detectó al menos uno de los genotipos de alto riesgo.

Entre los genotipos de alto riesgo, el detectado con más frecuencia fue VPH16 (21,9%), seguido por VPH18 (12,1%), VPH51 (10,6%), VPH68 (10,1%) y los genotipos VPH45 y 58 (9,9%). Los genotipos de probable alto riesgo más prevalentes fueron VPH53 (13,9%) y VPH66 (7,8%) y entre los genotipos de bajo riesgo, el detectado con mayor frecuencia fue VPH6 (18,2%), seguido de VPH72 (9,9%), VPH 11 (9,6%) y VPH 61 (8,6%). Los genotipos VPH84 (13,4%) y CP6108 (12,4%) fueron los más frecuentemente detectados entre los tipos con riesgo oncogénico desconocido. En la **tabla 4.5** se muestra la prevalencia de genotipos de VPH-AR función del estatus VIH-1, observándose diferencias significativas en su distribución en todos los genotipos excepto en VPH35, VPH39 y VPH45.

En el estudio y la caracterización de las infecciones múltiples sólo se consideraron los trece tipos de VPH-AR que es capaz de detectar la metodología de captura de híbridos. Como se muestra en la **tabla 4.6**, en el 16,2% de las muestras se detectó una infección con un único genotipo y en el 34,9% fueron infecciones por múltiples genotipos. No se establecieron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de infecciones simples para los pacientes no infectados e infectados por VIH-1 (14,6% *vs.* 16,8%  $p = 0,56$ ); no así en el caso de las infecciones múltiples para las que si se observaron diferencias estadísticamente significativas (24% *vs.* 55,2%  $p < 0,001$ ). En los pacientes con estatus VIH-1 desconocido se identificaron siete muestras con infección simple (28,0%) y cinco muestras en las que se detectó más de un genotipo (20,0%).

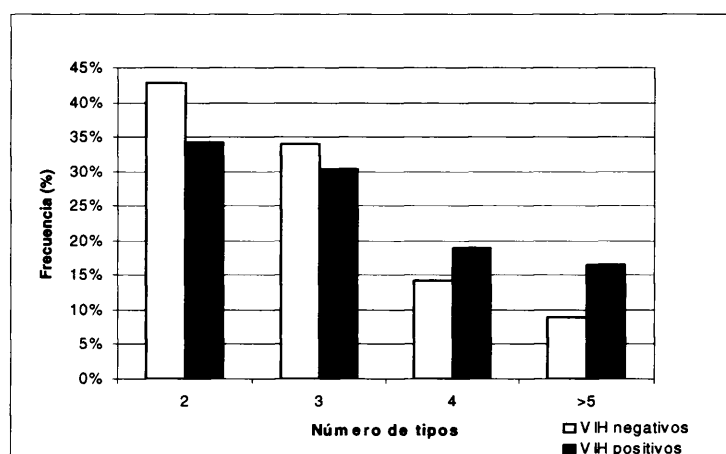
**Tabla 4.5.** Prevalencia de genotipos de VPH de alto riesgo de acuerdo con el estatus VIH-1 de los pacientes.

Genotipo VPH-AR	Estatus VIH-1				p-valor
	Negativo		Positivo		
	N	%	N	%	
	233	62,0	143	38,0	
VPH16	37	15,9	47	32,9	< 0,001
VPH18	22	9,4	24	16,8	0,035
VPH31	11	4,7	16	11,2	0,018
VPH33	9	3,9	13	9,1	0,036
VPH35	10	4,3	11	7,7	0,163
VPH39	17	7,3	19	13,3	0,055
VPH45	21	9,0	16	11,2	0,492
VPH51	18	7,7	22	15,4	0,019
VPH52	8	3,4	16	11,2	0,003
VPH56	10	4,3	21	14,7	< 0,001
VPH58	15	6,4	23	16,1	0,003
VPH59	14	6,0	22	15,4	0,003
VPH68	9	3,9	27	18,9	< 0,001

**Tabla 4.6.** Frecuencia de infecciones múltiples de acuerdo con el estatus VIH-1 de los pacientes.

	Estatus VIH-1								p-valor
	Negativo		Positivo		Desconocido		Total		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
	233	58,1	143	35,7	25	6,2	401	100	
Infección VPH-AR									
Simple	34	14,6	24	16,8	7	28,0	65	16,2	0,56
Múltiple	56	24,0	79	55,2	5	20,0	140	34,9	< 0,001

En la **figura 4.1** se muestra la frecuencia de infecciones por dos, tres, cuatro o más de cinco genotipos de VPH-AR, en función del estatus VIH-1 de los pacientes. Si bien se observó una mayor frecuencia de infecciones por más de tres genotipos de VPH-AR en los pacientes infectados por VIH-1, las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

**Figura 4.1.** Frecuencia de número de genotipos de VPH-AR en la población estudiada de acuerdo con el estatus VIH-1.

### **4.3. ANÁLISIS DE VARIANTES Y POLIMORFISMOS DE GENOTIPOS DE VPH-AR**

En el presente trabajo se ha realizado el análisis, caracterización y distribución de las variantes de los genotipos de VPH16, 18, 31, 33, y 52 mediante el análisis de secuencia en tres regiones del genoma que incluían: la región reguladora y las regiones codificantes de las proteínas virales oncogénicas E6 y E7. La región reguladora es la más variable en el genoma de VPH y es el principal sitio de control de la transcripción viral y como consecuencia, las mutaciones a este nivel podrían ser particularmente relevantes a la hora de modificar las propiedades biológicas del virus. En el caso de las oncoproteínas virales E6 y E7, aunque la secuencia está más conservada entre los diferentes genotipos, los cambios detectados pueden afectar a las funciones biológicas de las proteínas que codifican, implicadas en el control de la transformación y la inmortalización celular. En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de polimorfismos de la secuencia de nucleótidos en un total de 212 muestras: 88 muestras infectadas por VPH16, 48 muestras de VPH18, 29 muestras de VPH31, 22 muestras de VPH33 y 25 muestras infectadas por VPH 52.

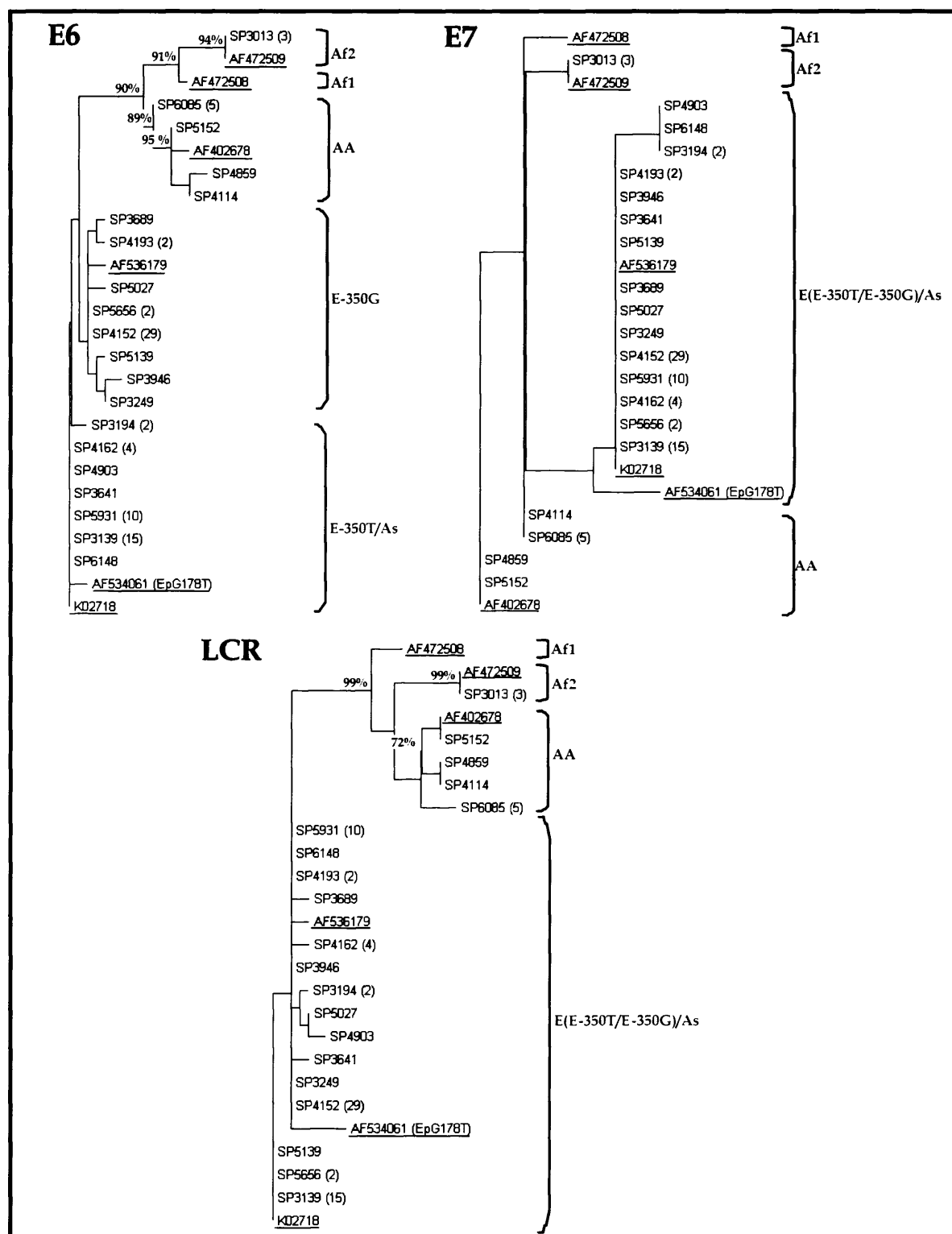
#### **4.3.1. Análisis de variantes de VPH16**

Se identificaron 88 muestras anales de HSH infectadas por VPH16, de las cuales en 83 se obtuvo una secuencia válida en las tres regiones genómicas de estudio para la identificación de variantes y para llevar a cabo el análisis filogenético de las mismas. La exclusión del resto fue debida, en cuatro muestras a que no se disponía de suficiente ADN y en una muestra, porque la calidad de la secuencia en dos de las tres regiones de estudio (E6 y E7), no era la óptima para el estudio de polimorfismos.

##### **4.3.1.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH16**

Para realizar el análisis filogenético de las muestras infectadas por VPH16 y con el fin de clarificar y simplificar los resultados obtenidos, todas las muestras que presentaban la misma secuencia de nucleótidos en las tres regiones del genoma analizadas, fueron representadas por una única secuencia. En total se identificaron 20 secuencias representativas de las 83 muestras de VPH16 estudiadas. En las variantes de VPH16, dentro de la rama Europea se dispone de secuencias de referencia de las clases E-350T y E-350G, por lo que se incluyeron en el análisis filogenético. Este hecho es exclusivo en este tipo de VPH.

Los fenogramas obtenidos en cada una de las regiones analizadas se muestran en la **figura 4.2.**



**Figura 4.2. Análisis filogenético de las 83 muestras caracterizadas como VPH16 en las regiones codificantes de E6, E7 y la región reguladora (LCR).** AA, rama Asiático-Americana; Af-1, rama Africana tipo 1; Af-2, rama Africana tipo 2; As, rama Asiática; E, rama Europea. K02718, secuencia de referencia de la rama Europea clase E-350T (Seedorf *et al.*, 1985); AF536179, secuencia de referencia de la rama Europea clase E-350G; AF402678, secuencia de referencia de la rama Asiático-Americana; AF472509, secuencia de referencia de la rama Africana tipo 2. Entre paréntesis se indica el número de muestras que comparten la misma secuencia y que han sido simbolizadas por la secuencia representativa. Los números situados en las ramas indican los valores de *bootstrap* mayores del 70%.



De las 83 muestras de VPH16, 72 (86,7%) fueron caracterizadas como pertenecientes a la rama Europea, de las cuales 34 pertenecían a la clase E-350T y 38 a la clase E-350G. De las once muestras restantes, ocho (9,6%) se clasificaron en la rama Asiático-Americana y tres (3,6%) en la rama Africana tipo 2. Las 34 muestras pertenecientes a la clase E-350T de la rama Europea, están representadas en el análisis filogenético por siete secuencias representativas: SP3139 (15 muestras), SP4162 (cuatro muestras), SP5931 (10 muestras), SP6148 (una muestra), SP4903 (una muestra), SP-3641 (una muestra) y SP3194 (dos muestras). Las 38 muestras clasificadas en la clase E-350G de la rama Europea, están representadas por ocho secuencias representativas: SP5656 (dos muestras), SP4152 (29 muestras), SP4193 (dos muestras), SP3249 (una muestra), SP3946 (una muestra), SP5027 (una muestra), SP3689 (una muestra) y SP5139 (una muestra). Las ocho muestras clasificadas en la rama Asiático-Americana, están representadas por las secuencias SP4114 (una muestra), SP4859 (una muestra), SP5152 (una muestra) y SP6085 (cinco muestras). Las tres secuencias caracterizadas como pertenecientes a la rama Africana tipo 2 están representadas por la secuencia SP3013.

La filogenia en la región codificante de E6 fue la que proporcionó una mayor información, ya que permitió la discriminación de las variantes Europeas en las dos clases descritas, hecho que no sucede al analizar las relaciones filogenéticas de las variantes de VPH16 en la región codificante de E7 y en la región reguladora.

El análisis de los valores de *bootstrap* en las regiones estudiadas, nos permitió indicar que en la región codificante de E7, todas las secuencias mostraron una mayor similitud entre ellas, ya que en dicha región los valores de *bootstrap* fueron menores del 70% en todos los casos.

Todas las muestras analizadas se clasificaron en la misma rama filogenética en las diferentes regiones genómicas, lo que implica la ausencia de variantes de VPH16 recombinantes o infecciones múltiples.

#### 4.3.1.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH16

Con el fin de simplificar el análisis de resultados en cada región del genoma, se estableció utilizar una nomenclatura uniforme para cada patrón descrito que incluyera: la rama filogenética asignada, el genotipo de VPH, la región estudiada y el número de patrón identificado. Los patrones dentro de cada rama, genotipo y región se denominaron con números correlativos en orden descendente de frecuencia de los mismos.

#### 4.3.1.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6

El análisis de la región codificante de E6 mediante la secuenciación completa del gen, permitió identificar trece patrones diferentes a la secuencia prototipo, ocho pertenecientes a la rama Europea (E-16-E6-1 hasta E-16-E6-8), cuatro a la rama Asiático-Americana (AA-16-E6-1 hasta AA-16-E6-4) y uno a la rama Africana tipo 2 (Af2-16-E6-1).

Como se muestra en la **tabla 4.7** el patrón más frecuente fue el prototipo, que se identificó en 32 muestras (38,5%), seguido por el patrón E-16-E6-1, que incluye un único cambio en el nucleótido en posición 350(T→G) y que fue identificado en 31 secuencias (37,3%). Los patrones E-16-E6-2 y el E-16-E6-3, se identificaron en dos secuencias (2,4%). El primero de ellos presentó dos cambios en las posiciones 350(T→G) y 176(G→C) y el patrón E-16-E6-3 presentó un cambio único en la posición 109(T→C) descrito previamente en la bibliografía; y además fue el único de los patrones (excluyendo la secuencia prototipo), en el que no se identificó cambio en la posición nucleotídica 350. El resto de patrones descritos en esta rama (E-16-E6-4, E-16-E6-6, E-16-E6-7, E-16-E6-8) identificó a un grupo secuencias que presentaban además del cambio en el nucleótido 350(T→G), una serie de cambios adicionales en posiciones nucleotídicas ya descritas en esta región. El patrón E-16-E6-5 se caracterizó por presentar en la secuencia un cambio en la posición 132. Dicho cambio es mayoritario en las variantes pertenecientes a la rama Africana, pero muy infrecuente en las pertenecientes a la rama Europea.

**Tabla 4.7.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E6 y frecuencia de los patrones en las 83 muestras de VPH16 analizadas.

Rama	Clase	Patrón	Secuencia VPH16 E6																Total	
			1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	4	5			
			0	3	4	4	7	8	8	7	8	8	9	3	5	0	3			
			9	2	3	5	6	3	8	1	6	9	3	5	0	3	2	N	%	
E	E-350T	Prototipo	T	G	C	G	G	T	G	T	T	A	G	C	T	A	A	32	38,5	
	E-350G	E-16-E6-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	31	37,3	
	E-350G	E-16-E6-2	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	2	2,4	
	E-350T	E-16-E6-3	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2,4	
	E-350G	E-16-E6-4	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	G	-	-	1	1,2	
	E-350G	E-16-E6-5	-	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	G	-	-	1	1,2	
	E-350G	E-16-E6-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	G	-	-	1	1,2	
	E-350G	E-16-E6-7	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	1	1,2	
	E-350G	E-16-E6-8	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	G	-	-	1	1,2	
AA	AAa	AA-16-E6-1	-	-	-	T	-	-	-	-	A	G	-	T	G	-	-	5	6	
	AAc	AA-16-E6-2	-	-	-	T	-	G	-	-	A	G	-	T	G	-	G	1	1,2	
	AAc	AA-16-E6-3	-	-	-	T	-	G	-	C	A	G	-	T	G	-	G	1	1,2	
	AAa	AA-16-E6-4	-	-	-	T	-	-	-	-	A	G	-	T	G	-	G	1	1,2	
Af2	Af2a	Af2-16-E6-1	C	T	G	T	-	-	-	-	A	G	-	T	-	G	-	3	3,6	

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; AA, Asiático-Americana; Af2, Africana tipo 2; E, Europea.

Once secuencias fueron caracterizadas como variantes no Europeas, de las cuales ocho se asignaron a la rama Asiático-Americana (seis a la clase AAa y dos a la clase AAc) y tres secuencias a la rama Africana tipo 2.

En la rama Asiático-Americana se identificaron cuatro patrones diferentes, siendo el patrón AA-16-E6-1 el más prevalente (6,0%). Todas las secuencias pertenecientes a esta rama filogenética presentaban cinco cambios comunes en las posiciones nucleotídicas: 145(G→T), 286(T→A), 289(A→G), 335(C→T) y 350(T→G) y las secuencias clasificadas en la clase AAc presentaron dos cambios adicionales, uno en posición 532(A→G) y uno característico de esta clase en la posición 183(T→G). Estas variantes representadas por los patrones AA-16-E6-2 y AA-16-E6-3, se identificaron en una única secuencia (1,2%). La variante AA-16-E6-3 presentó un cambio adicional en el nucleótido 271(T→C).

Las tres secuencias restantes (3,6%) pertenecientes a la rama Africana tipo 2, clase Af2a presentaban un mismo patrón que se denominó Af2-16-E6-1 e incluyó ocho cambios en la secuencia que ya habían sido descritos previamente en la bibliografía para esta clase y rama filogenética.

En la **tabla 4.8** se muestran los cambios nucleotídicos detectados, la frecuencia de los mismos, así como su relevancia a nivel de traducción de la proteína. De las 15 posiciones con mutación descritas en la región codificante de E6, la mutación que se observó con más frecuencia (55,4%), tanto en las variantes pertenecientes a la rama Europea como a las ramas no Europeas, fue la transversión en la posición nucleotídica 350 que dio lugar al cambio de Leucina a Valina en el aminoácido en posición 83 (L83V). Del resto de los cambios que se detectaron en la región, seis fueron mutaciones silenciosas y ocho fueron mutaciones que implicaban cambio de aminoácido, siendo en estas últimas los cambios más frecuentes (detectados en el 13,3% de las 83 secuencias analizadas), aquellos localizados en las posiciones nucleotídicas 145(G→T) y 335(C→T), siendo la primera un cambio de aminoácido neutro (Glutamina) a básico (Histidina) en el codón 14 (Q14H); y la segunda un cambio de aminoácido básico (Histidina) a aromático (Tirosina) en el codón 78 (H78Y). Ambos cambios se localizaron sólo en secuencias asignadas a ramas no Europeas.

**Tabla 4.8.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH16 en la región codificante de E6, de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Rama	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
			Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	%
E6	E/Af2	109	T	C	F	-	2	Ts, S	5	6
	E/Af2	132	G	C/T	R	T/I	10	Tv/Tv, Ms/Ms	4	4,8
	Af	143	C	G	Q	E	14	Tv, Ms	3	3,6
	AA/Af2	145	G	T	Q	H	14	Tv, Ms	11	13,3
	E	176	G	C/A	D	H/N	25	Tv/Ts, Ms/Ms	3	3,6
	AA	183	T	G	I	R	27	Tv, Ms	2	2,4
	E	188	G	C/A	E	Q/K	29	Tv/Ts, Ms/Ms	3	3,6
	AA	271	T	C	D	-	56	Tv, S	1	1,2
	AA/Af2	286	T	A	A	-	62	Tv, S	11	13,3
	AA/Af2	289	A	G	V	-	63	Ts, S	11	13,3
	E	293	G	A	D	N	64	Ts, Ms	1	1,2
	AA/Af2	335	C	T	H	Y	78	Ts, Ms	11	13,3
	E/AA	350	T	G	L	V	83	Tv, Ms	46	55,4
	Af2	403	A	G	L	-	100	Ts, S	3	3,6
	AA	532	A	G	S	-	143	Ts, S	3	3,6

AA, Asiático-Americana; Af2, Africana tipo 2; E, Europea; Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa.

#### 4.3.1.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7

El estudio de la secuencia completa de la región que codifica la proteína viral E7, nos permitió identificar cinco patrones diferentes, dos en la rama Europea (prototipo y E-16-E-1), dos en la rama Asiático-Americana (AA-16-E7-1 y AA-16-E7-2) y uno en la rama Africana tipo 2 (Af2-16-E7-1). Todos ellos habían sido descritos previamente en la bibliografía. Como se muestra en la **tabla 4.9**, de las 72 muestras caracterizadas como pertenecientes a la rama Europea, 68 (81,9%) presentaron la secuencia prototipo y las cuatro secuencias restantes (4,8%), identificadas como el patrón E-16-E7-1, presentaron un único cambio en la posición 822(A→G).

**Tabla 4.9.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E7 y frecuencia de los patrones en las 83 muestras de VPH16 analizadas.

Rama	Patrón	Secuencia VPH16 E7					Total	
		6	7	7	7	8	N	%
		4	3	8	9	2		
		7	2	9	5	2		
E	Prototipo	A	T	T	T	A	68	81,9
	E-16-E7-1	-	-	-	-	G	4	4,8
AA	AA-16-E7-1	-	-	C	G	-	5	6
	AA-16-E7-2	-	C	C	G	-	3	3,6
Af2	Af2-16-E7-1	G	-	C	A	-	3	3,6

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; AA, Asiático-Americana; Af2, Africano tipo 2; E, Europea.

De la misma forma que en la región codificante de E6, en la región codificante de E7 las once secuencias restantes se asignaron a ramas no Europeas. En la rama Asiático-Americana se identificaron dos patrones, siendo AA-16-E7-1 el más frecuente (6,0%) con cambios en dos posiciones: 789(T→C) y 795(T→G). El patrón AA-16-E7-2, se presentó en tres secuencias (3,6%), y se definió con los cambios descritos en el patrón AA-16-E7-1 y un cambio adicional en posición 732(T→C). En la rama Africana tipo 2 se detectó un único patrón, Af2-16-E7-1, con cambios en las posiciones: 647(A→G), 789(T→C) y 795(T→A).

En la **tabla 4.10** se indican las posiciones nucleotídicas con mutación descritas en la región codificante de E7, los aminoácidos alterados y la frecuencia de estos cambios. En la región, sólo una transición dio lugar a un cambio de aminoácido, de Asparagina a Serina en el codón en posición 29, y fue detectado en las tres muestras pertenecientes a la rama Africana tipo 2 (3,6%). El resto de los cambios detectados fueron mutaciones silenciosas. En las variantes Europeas la sustitución nucleotídica identificada en la posición 822(A→G), que no produjo ningún cambio de aminoácido en el codón 97; en las variantes no Europeas se detectaron con la misma frecuencia (13,3%) las mutaciones 789(T→C), 795(T→G/A), aunque tampoco dan lugar a ningún cambio en la secuencia de aminoácidos.

**Tabla 4.10.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH16 en la región codificante E7, de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Rama	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
			Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	%
E7	Af2	647	A	G	N	S	29	Ts, Ms	3	3,6
	AA	732	T	C	F	-	57	Ts, S	3	3,6
	AA/Af2	789	T	C	I	-	76	Ts, S	11	13,3
	AA/Af2	795	T	G/A	T	-	78	Tv, S	11	13,3
	E	822	A	G	L	-	97	Ts, S	4	4,8

AA, Asiático-Americana; Af2, Africana tipo 2; E, Europea; Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa.

El número de mutaciones con sentido localizadas fue mayor en la región codificante de E6 frente a la región codificante de E7 (60% *vs.* 20%), sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas regiones ( $p = 0,12$ ).

#### 4.3.1.2.3. Polimorfismos en la región reguladora

El estudio de 363 pb de la región reguladora nos permitió identificar ocho patrones de nucleótidos diferentes que se denominaron: E-16-LCR-1 hasta E-16-LCR-4; AA-16-LCR-1 hasta AA-16-LCR-3 y Af2-16-LCR-1 (**Tabla 4.11**). En todos los casos a excepción de uno (AA-16-LCR-1), los patrones pertenecían a alguna de las variantes de VPH16 ya descritas.

**Tabla 4.11.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región reguladora estudiada y frecuencia de los patrones en las 83 muestras de VPH16 analizadas.

Rama	Patrón	Secuencia VPH16 LCR																	Total		
		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7			
		4	4	4	5	5	5	6	6	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8		
		8	8	9	0	2	5	6	8	1	2	4	6	8	8	2	3	3	3		
		5	9	6	7	1	2	9	9	4	9	3	4	4*	6	6	4	7	9	N	%
E	Prototipo	A	G	T	A	G	G	C	C	T	A	T	C	C	C	G	G	A	A	17	20,5
	E-16-LCR-1	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47	56,6
	E-16-LCR-2	-	-	-	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4,8
	E-16-LCR-3	-	-	C	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3,6
	E-16-LCR-4	-	-	-	-	A	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,2
AA	AA-16-LCR-1	C	A	-	-	A	-	T	A	-	C	-	T	T	T	-	T	-	-	5	6
	AA-16-LCR-2	C	A	-	G	A	-	T	A	-	C	-	T	-	T	-	-	-	-	2	2,4
	AA-16-LCR-3	C	A	-	-	A	-	T	A	-	C	G	T	-	T	-	-	-	-	1	1,2
Af2	Af2-16-LCR-1	C	A	-	-	A	-	T	-	-	-	-	T	-	T	A	T	C	G	3	3,6

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez y en negrita los patrones identificados por primera vez; AA, Asiático-Americana; Af2, Africana tipo 2; E, Europea.

En la rama Europea se identificaron además de la secuencia prototipo, cuatro patrones diferentes nombrados desde E-16-LCR-1 hasta E-16-LCR-4. La secuencia prototipo se identificó en 17 muestras (20,5%), y el patrón E-16-LCR-1, con una sustitución nucleotídica en la posición 7521(G→A), fue el más frecuentemente detectado al identificarse en 47 muestras (56,6%). Los patrones E-16-LCR-2, E-16-LCR-3 y E-16-LCR-4 se observaron en cuatro (4,8%), tres (3,6%) y una (1,2%) muestras respectivamente, y las secuencias que los presentaron, además del cambio mencionado en la posición 7521, presentaron cambios adicionales en las posiciones 7552(G→A) el patrón E-16-LCR-2; 7496(T→C) el patrón E-16-LCR-3; y 7714(T→G) el patrón E-16-LCR-4.

En la rama Asiático-Americana se pudieron identificar tres patrones diferentes: AA-16-LCR-1, AA-16-LCR-2 y AA-16-LCR-3, siendo el primero el detectado más frecuentemente (6,0%). Las variantes con este patrón presentaron los cambios definidos para una variante descrita previamente, más un cambio adicional en la posición nucleotídica 7784(C→T) que no había sido descrito hasta el momento, por lo que las muestras que presentaron este patrón se consideraron variantes nuevas. Las tres muestras que presentaban los patrones AA-16-LCR-2 y AA-16-LCR-3 tenían ocho cambios comunes y sólo se diferenciaban en un cambio adicional, las dos variantes AA-16-LCR-2 tenían un cambio en posición 7507(A→G) y la variante AA-16-LCR-3, detectada en una secuencia (1,2%), un cambio en la posición 7743(T→G).

El patrón Af2-16-LCR-1 se identificó en tres secuencias pertenecientes a la rama Africana tipo 2, y se definió con cambios en las posiciones: 7485(A→C), 7489(G→A),

7521(G→A), 7669(C→T), 7764(C→T), 7786(C→T), 7826(G→A), 7834(G→T), 7837(A→C), 7839(A→G).

En la **tabla 4.12** se muestran el análisis de las mutaciones identificadas en la región reguladora, los factores reguladores de la transcripción viral que pueden verse afectados así como la frecuencia de estos cambios. En los patrones descritos se observaron 18 sustituciones nucleotídicas con respecto a la secuencia de referencia, y en ocho de ellas se afectaron los sitios de unión de cinco factores de transcripción: el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE, *Glucocorticoid Response Elements*), el factor YY-1, el factor nuclear 1 (NF-1, *Nuclear Factor 1*), el potenciador de transcripción del factor 1 (TEF-1, *Transcriptional Enhancer Factor 1*) y el octámero de unión para el factor 1 (Oct-1, *Octamer Binding Transcription Factor 1*). La mayoría de los patrones identificados en la región reguladora (79,5%), incluían la mutación en la posición nucleotídica 7521, que supone la transición G→A, y que afecta a uno de los sitios de unión de los factores de transcripción YY1 y NF1. Este cambio se identificó en muestras que fueron asignadas a todas las ramas identificadas en este trabajo. Se identificaron con la misma frecuencia (13,3%) cambios en las posiciones nucleotídicas 7485(A→C), 7489(G→A), 7669(C→T), 7764(C→T) y 7786(C→T), aunque sólo la transversión y la transición de las posiciones 7485 y 7786 respectivamente, alteraban los sitios de unión del factor de transcripción YY-1 y GRE. En ambos casos, la mutación sólo se presentó en muestras clasificadas en las ramas no Europeas. La mutación C→A descrita en la posición nucleotídica 7689 que se observó con una frecuencia menor (9,6%), afectó al sitio de unión de TEF-1 y sólo se presentó en las muestras asignadas a la rama Asiático-Americana. La nueva posición nucleotídica 7784(C→T) se identificó sólo en muestras asignadas a la rama Asiático-Americana (6%), y este cambio puede afectar al sitio de unión de Oct-1. La transición G→A descrita en la posición 7826, se identificó en tres muestras (3,6%) que fueron asignadas a la rama Africana tipo 2, y afectó al sitio de unión de los factores YY-1 y TEF-1. Los cambios descritos en las posiciones nucleotídicas 7714 y 7743, que afectaron a los sitios de unión de los factores NF-1 y TEF-1 respectivamente, sólo se observaron en dos muestras (1,2%) que pertenecían a las ramas Europea y Asiático-Americana. El resto de mutaciones observadas en las secuencias nucleotídicas no tuvieron implicaciones a nivel de alteración de los factores de transcripción.

**Tabla 4.12.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH16 en la región reguladora de acuerdo con la posición nucleotídica, sitio de unión, y tipo de mutación.

Región	Rama	Posición nucleótido	Nucleótido		Sitio de unión	Tipo de mutación	Total	
			Prototipo	Variante			N	%
LCR	AA/Af2	7485	A	C	YY-1,GRE	Tv	11	13,3
	AA/Af2	7489	G	A	-	Ts	11	13,3
	E	7496	T	C	-	Ts	3	3,6
	AA	7507	A	G	-	Ts	2	2,4
	E/AA/Af2	7521	G	A	YY-1,NF1	Ts	66	79,5
	E	7552	G	A	-	Ts	4	4,8
	AA/Af2	7669	C	T	-	Ts	11	13,3
	AA	7689	C	A	TEF-1	Tv	8	9,6
	E	7714	T	G	NF-1	Tv	1	1,2
	AA	7729	A	C	-	Tv	8	9,6
	AA	7743	T	G	TEF-1	Tv	1	1,2
	AA/Af2	7764	C	T	-	Ts	11	13,3
	AA	7784	C	T	Oct-1	Ts	5	6
	AA/Af2	7786	C	T	YY-1	Ts	11	13,3
	Af2	7826	G	A	YY-1,TEF-1	Ts	3	3,6
	AA/Af2	7834	G	T	-	Tv	8	9,6
	Af2	7837	A	C	-	Tv	3	3,6
	Af2	7839	A	G	-	Ts	3	3,6

AA, Asiático-Americana; Af2, Africana tipo 2; E, Europea; Ts, transición; Tv, transversión; GRE, Elemento de respuesta a glucocorticoides; NF-1, Factor nuclear 1; Oct-1, octámero de unión para el factor 1; TEF-1, potenciador de transcripción del factor 1; YY-1, Factor ying-yang 1.

#### 4.3.1.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora

En el análisis de las secuencias no se localizaron inserciones o deleciones. Las variantes de la región codificante de E6 presentaron desde un cambio de nucleótido con respecto a la secuencia de referencia (0,2%) hasta un máximo de ocho cambios de nucleótidos (1,7%); en la región codificante de E7 las variantes de este trabajo presentaron desde un cambio (0,3%) hasta tres cambios de nucleótidos (1%); y en la región reguladora se identificaron variantes que incluyeron desde un cambio único (0,3%) hasta diez cambios de nucleótidos (2,6%). La media de variaciones puntuales con respecto a la variante prototipo en la región codificante de E6 fue de cuatro cambios ( $3,5 \pm 3,1$ ; rango 1-8 mutaciones;  $p = 0,08$ ), de dos cambios en la región codificante de E7 ( $1,8 \pm 1,2$ ; rango 1-3 mutaciones;  $p = 0,3$ ) y de cinco cambios en la región reguladora (media de  $4,7 \pm 4,2$ ; rango 1-10 mutaciones;  $p = 0,04$ ).

Para llevar a cabo el análisis total de la variabilidad genética en cada una de las regiones del genoma estudiadas, se comparó el número total de nucleótidos con variación ajustando por la longitud del amplicón secuenciado. La variabilidad de la región codificante de E6 fue generada por 17 cambios de nucleótidos puntuales (3,1%); la variabilidad de la región codificante de E7 por cinco mutaciones (1,7%); y la de la región reguladora por 18



cambios de nucleótidos en un total de 363 pb analizadas (4,9%). Los datos de variabilidad genética observada no fueron estadísticamente significativos cuando se compararon las regiones codificantes de E6 y E7 ( $p = 0,19$ ) y la región reguladora con la región codificante de E6 ( $p = 0,31$ ); sin embargo la región reguladora si presentó una variabilidad genética significativamente mayor al compararse con la región codificante de E7 ( $p < 0,05$ ). Las mutaciones en posiciones únicas en los nucleótidos 271, 293 de la región codificante de E6; y 7714 y 7743 de la región reguladora se identificaron en muestras individuales.

#### 4.3.1.4. Distribución de variantes de VPH16 entre los pacientes

En la **tabla 4.13** se indica de manera global las variantes identificadas en las 83 muestras infectadas por VPH16 y su distribución: 72 muestras se asignaron en la rama Europea (86,7%), ocho muestras en la rama Asiático-Americana (9,6%) y tres muestras en la rama Africana tipo 2 (3,6%). De las muestras asignadas a la rama Europea, 34 muestras (47,2%) fueron clasificadas en la clase E-350T, y las 38 muestras restantes (52,8%) se asignaron en la clase E-350G. Se identificó una variante no descrita previamente en la bibliografía perteneciente a la rama Asiático-Americana (indicada en negrita en la tabla).

En las variantes Europeas asignadas a la clase E-350T, la variante representada por la secuencia SP3139 fue la más frecuente detectándose en 15 muestras (18,1%) y se caracterizó por presentar la secuencia prototipo en las tres regiones analizadas. La variante representada por la secuencia SP5931 e identificada en diez muestras (12%) sólo presentó un cambio en la región reguladora. En orden decreciente de frecuencia le siguieron las variantes representadas por las secuencias: SP4162 (detectada en cuatro muestras), con la secuencia prototipo en las regiones codificantes y dos cambios en la región reguladora; SP3194 (detectada en dos muestras) con un único cambio en las regiones codificantes de E6 y E7 y dos cambios en la región reguladora; SP6148, SP4903 y SP3641 identificadas en una única muestra clínica cada una de ellas y presentando todas ellas la secuencia prototipo en la región codificante de E6.

**Tabla 4.13.** Asignación de variantes para cada rama filogenética en función de los patrones identificados en cada región genómica analizada y frecuencia de las mismas para los 83 aislados de VPH16 estudiados.

[illegible]

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez; E, Europea; Af2, Africana tipo 2. En la parte inferior de las posiciones de nucleótidos con mutaciones se indican los cambios de aminoácidos (regiones E6 y E7) y los sitios de unión de factores de transcripción alterados (LCR). Se indican en negrita las variantes y patrones no descritos hasta el momento.

En las variantes Europeas asignadas a la clase E-350G, la variante representada por la secuencia SP4152 fue la más frecuente del presente trabajo, detectándose en 29 muestras clínicas. Se caracterizó por la presencia del cambio propio de la clase en la región codificante de E6 y un cambio adicional en la posición nucleotídica 7521 de la región reguladora, que afecta al sitio de unión de los factores de transcripción YY1 y NF1. Este cambio además se identificó en todas las variantes asignadas a esta clase Europea, con la única excepción de la variante representada por la secuencia SP5656, que presentó la secuencia prototipo. Todas las variantes detectadas en esta clase habían sido descritas previamente en la bibliografía y no se observaron variaciones en la región codificante de la proteína E7.

Las variantes pertenecientes a la clase E-350T de la rama Europea no presentaron ningún cambio en la secuencia de aminoácidos de las regiones codificantes de E6 y E7; sin embargo en el 56% de las muestras, las variantes presentaban un cambio en la posición nucleotídica 7521 en la región reguladora que afecta a la unión de dos factores de transcripción (YY-1 y NF1). Todas las variantes de la clase E-350G de la rama Europea identificadas no presentaron cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína E7, sin embargo en la secuencia de aminoácidos de la oncoproteína E6, se observó desde un cambio en las variantes representadas por las secuencias SP5656 y SP4152, hasta tres cambios en la variante representada por la secuencia SP3249.

En la rama Asiático-Americana, se identificaron variantes pertenecientes a las clases AAa y AAC, y se identificó una variante hasta el momento no descrita representada por la secuencia SP6085, siendo la más frecuente y estando presente en cinco muestras (6%). De la misma forma que las variantes Europeas, se observó que las mutaciones puntuales detectadas en la región que codifica la proteína E7 no implicaban cambios en la secuencia de aminoácidos de la misma. Este hecho no se observa al analizar la región codificante de E6, en la que los cambios nucleotídicos presentes inducen a cambios en tres (SP6085, SP5152) y cuatro aminoácidos (SP4114, SP4859) de la secuencia proteica. En la región reguladora se describieron cuatro cambios en posiciones nucleotídicas que afectaban a sitios de unión de factores de transcripción que estaban presentes en todas las variantes (YY1, GRE, NF-1, TEF-1); y en la variante nueva representada por la secuencia SP6085 y la variante representada por SP5152 se presentaron dos posiciones exclusivas que afectaba a los sitios de unión de los factores de transcripción Oct-1 y TEF-1, respectivamente.

Las tres muestras asignadas a la rama Africana tipo 2, se clasificaron en la clase Af2a y fueron representadas por la secuencia SP3013 (3,6%). Esta variante presentó cuatro cambios de aminoácidos en la región codificante de E6, y el único cambio de aminoácido en

la región codificante de E7 descrito en las variantes de este trabajo fue de Asparagina a Serina en el codón en posición 29 (N29S). Los cambios en posiciones nucleotídicas que afectaron a sitios de unión para factores de transcripción fueron cuatro, tres de ellos descritos en las variantes Europeas y Asiático-Americanas, y uno en la posición nucleotídica 7826 que afectó al sitio de unión de los factores YY1 y TEF-1.

#### 4.3.1.5. Distribución de variantes de VPH16 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes

Para analizar la distribución de variantes de VPH16 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes y con el fin de aumentar la potencia estadística, se agruparon las variantes en pertenecientes a la rama Europea y no pertenecientes a la misma, incluyéndose en este último grupo las variantes asignadas a las ramas Asiático-Americana y Africana (Tabla 4.14). La distribución de las variantes de VPH16 de los 83 pacientes de acuerdo con su estatus frente a la infección por VIH-1 se llevó a cabo en 34 pacientes que no estaban infectados por VIH-1 y en 45 pacientes que estaban infectados por VIH-1. El análisis de la distribución en función del origen geográfico de los pacientes se realizó en 56 pacientes españoles y en 25 procedentes de países latinoamericanos. Seis pacientes fueron excluidos del análisis, cuatro pacientes con el estatus VIH-1 desconocido y dos pacientes de origen europeo no español.

Tanto en los pacientes infectados como no infectados por VIH-1, las variantes más frecuentes fueron las Europeas, no observándose diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos de estudio. Los resultados fueron similares al analizar la influencia del origen geográfico en la distribución de variantes, ya que tanto en los pacientes españoles como en los procedentes de países latinoamericanos las variantes Europeas fueron las mayoritarias, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. En el análisis univariable de la infección de variantes Europeas *vs.* no Europeas, ninguna de las variables del estudio, estuvieron asociadas a la infección.

**Tabla 4.14.** Prevalencia y análisis univariable de las variantes asignadas a las ramas Europeas y no Europeas de VPH16 de acuerdo al estatus VIH-1 y al origen geográfico de los pacientes.

	Total	Prevalencia		p-valor	OR (IC95%)
	N (%)	Variantes Europeas N (%)	Variantes no Europeas N (%)		
<b>Estatus VIH-1</b>	<b>79</b>				
Negativo	34 (100)	31 (91,2)	3 (8,8)	0,245	1
Positivo	45 (100)	37 (82,2)	8 (17,8)		2,23 (0,54-9,15)
<b>Origen geográfico</b>	<b>81</b>				
España	56 (100)	50 (89,3)	6 (10,7)	0,273	1
Latinoamérica	25 (100)	20 (80)	5 (20)		2,08 (0,57-7,60)

### **4.3.2. Análisis de variantes de VPH18**

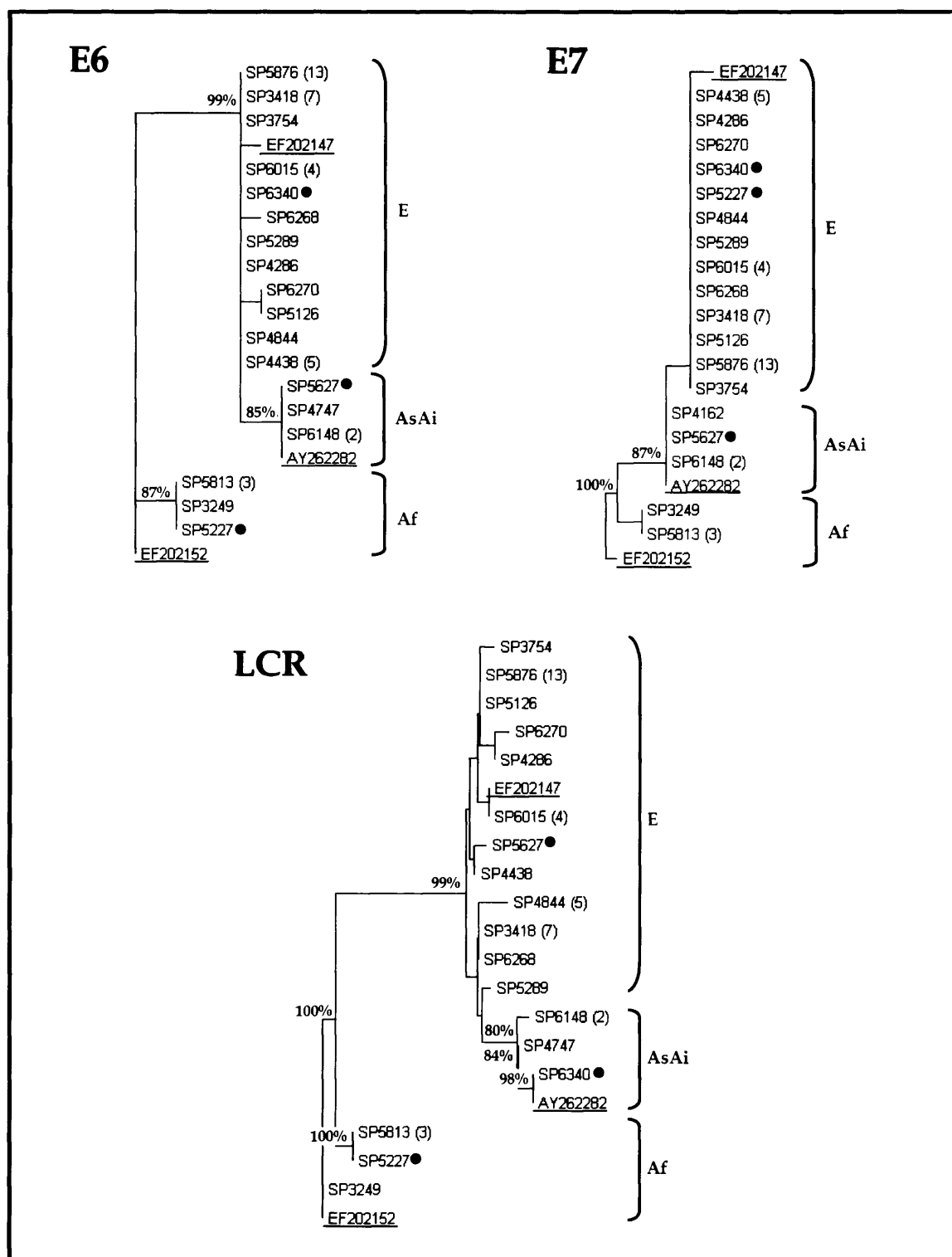
Se identificaron 48 muestras anales de HSH infectadas por VPH18, aunque se llevó a cabo el análisis de polimorfismos en 46 muestras; en un caso porque no se obtuvo suficiente ADN para el análisis y en otro porque la calidad de la secuencia que se obtuvo en múltiples repeticiones, no fue óptima para el estudio en ningún caso.

#### **4.3.2.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH18**

El análisis filogenético de las muestras se hizo empleando el mismo criterio que en las muestras de pacientes infectados por VPH16, de forma que aquellas muestras que mostraban la misma secuencia de nucleótidos en la región analizada, fueron representadas por una única secuencia. En total, fueron 18 las secuencias representativas de las 46 muestras infectadas por VPH18 y los fenogramas obtenidos en cada una de las regiones estudiadas se muestran en la **figura 4.3**.

Del total de muestras estudiadas, en tres muestras (6,5%) la asignación filogenética de cada región estudiada no fue la misma, y correspondieron a las tres secuencias representadas como: SP5627, SP6340 y SP5227. En las 43 muestras restantes (93,5%) la asignación filogenética fue igual en las tres regiones y fueron representadas por quince secuencias. De ellas, tres muestras (7%) se caracterizaron como pertenecientes a la rama Asiático-Amerindia, en la que se incluye la secuencia de referencia; 36 muestras (83,7%) fueron asignadas a la rama Europea, y cuatro muestras (9,3%) se incluyeron en la rama Africana.

Las muestras pertenecientes a la rama Asiático-Amerindia están indicadas en el análisis filogenético por dos secuencias representativas: SP6148 (dos muestras) y SP4747 (una muestra). Las muestras de la rama Europea, están representadas por once secuencias representativas: SP5876 (13 muestras), SP3418 (siete muestras), SP3754 (una muestra), SP6015 (cuatro muestras), SP6268 (una muestra), SP5289 (una muestra), SP4286 (una muestra), SP6270 (una muestra), SP5126 (una muestra), SP4844 (una muestra), SP4438 (cinco muestras). En la rama Africana, las cuatro muestras identificadas se han representado por dos secuencias: SP5813 (tres muestras) y SP3249 (una muestra).



**Figura 4.3. Análisis filogenético de las 46 muestras caracterizadas como VP18 en las regiones de E6, E7 y en la región reguladora (LCR).** Af, rama Africana; AsAi, rama Asiático-Amerindia; E, rama Europea. AY262282, secuencia de referencia perteneciente a la rama Asiático-Amerindia (Narechania *et al.*, 2005). EF202147, secuencia de referencia de la rama Europea; EF202152, secuencia de referencia de la rama Africana. Entre paréntesis se indica el número de muestras que comparten la misma secuencia y que ha sido simbolizada por la secuencia representativa. Los números situados en las ramas indican los valores de *bootstrap* mayores del 70%. Los círculos rojos indican las muestras recombinantes de VP18.

Las tres muestras asignadas a distintas ramas en las tres regiones estudiadas fueron clasificadas como infecciones recombinantes de VPH18 y se caracterizaron porque la muestra SP-6340 se asignó en las regiones codificantes de E6 y E7 a la rama Europea, y en la región de LCR a la rama Asiático-Amerindia; la muestra SP5627 se asignó en las regiones codificantes a la rama Asiático-Amerindia, mientras en la región reguladora se agrupó como una variante Europea; y por último la muestra SP5227 se caracterizó como una variante Africana en la región codificante E6 y en la regiones reguladora y codificante de E7 se agrupó con las variantes de la rama Europea.

Tanto en las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7, como en la región reguladora, la filogenia obtenida fue válida para la clasificación de las 46 muestras analizadas en las tres ramas filogenéticas descritas para este tipo de VPH. No se llevo a cabo división en clases en ninguna rama filogenética porque esta clasificación no se ha descrito de manera homogénea en la bibliografía.

#### 4.3.2.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH18

La nomenclatura empleada para indicar los patrones de nucleótidos descritos en las regiones analizadas ha sido la misma que la empleada en VPH16.

##### 4.3.2.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6

El análisis de polimorfismos en la región codificante de E6 se llevó a cabo en la totalidad del gen y como se indica en la **tabla 4.15** se identificaron cuatro patrones además de la secuencia prototipo, tres en la rama Europea y uno en la rama Africana.

En la rama Asiático-Amerindia, las cuatro secuencias identificadas presentaron el patrón prototipo (8,7%).

En la rama Europea, se describieron tres patrones. El patrón E-18-E6-1 que fue el más frecuente al identificarse en 34 secuencias (73,9%), y presentó dos cambios en los nucleótidos 485(T→C) y 549(C→A), que ya habían sido descritos previamente.

Los patrones E-18-E6-2 y E-18-E6-3 identificados en dos (4,8%) y una secuencia (2,7%) respectivamente, presentaron tres cambios con respecto a la secuencia de referencia. Ambas se consideraron nuevas; E-18-E6-2 al incluir un cambio en la posición 314(T→G) y E-18-E6-3 por la presencia de un cambio en la posición 467(T→C).

Las cinco secuencias restantes (10,9%) se clasificaron en la rama Africana, y presentaron un patrón idéntico entre ellas que incluyó nueve cambios en la secuencia y que se denominó Af-18-E6-1.

**Tabla 4.15.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E6 y frecuencia de los patrones en las 46 muestras de VPH18 analizadas.

Rama	Patrón	Secuencia VPH18 E6												Total	
		2	2	3	3	3	3	4	4	4	5	5			
		5	6	1	1	4	7	6	8	9	4	4			
		1	6	4*	7	2	4	7*	5	1	8	9	N	%	
<b>AsAi</b>	<b>Prototipo</b>	T	G	T	T	C	G	T	T	C	A	C	4	8,7	
<b>E</b>	<b>E-18-E6-1</b>	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	A	34	73,9	
	<b>E-18-E6-2</b>	-	-	G	-	-	-	-	C	-	-	A	2	4,3	
	<b>E-18-E6-3</b>	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	A	1	2,2	
<b>Af</b>	<b>Af-18-E6-1</b>	C	A	-	C	T	A	-	C	A	G	A	5	10,9	

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez y en negrita los patrones identificados por primera vez; Af, Africana; AsAi, Asiático-Amerindia; E, Europea.

Los cambios de nucleótidos identificados en los 476 pb de la región codificante de E6, la frecuencia de los mismos y su relevancia en la secuencia proteica se indican en la **tabla 4.16**. Se describieron un total de once posiciones con cambio que se identificaron en muestras asignadas en las ramas Europea y Africana. Las mutaciones más frecuentes fueron la transición T→C y la transversión C→A en las posiciones nucleotídicas 485 y 549. Las dos mutaciones se identificaron en 42 muestras (91,3%) pertenecientes a las ramas Europea y Africana, y ambas dieron lugar a una mutación silenciosa. De las mutaciones descritas en la región, tres posiciones nucleotídicas dieron lugar a cambios de aminoácidos. Los cambios incluyeron la posición 314(T→G), descrita por primera vez en este trabajo y observada en dos muestras (4,3%) asignadas a la rama Europea, que indujo un cambio de Ácido Aspártico a Ácido Glutámico en el codón en posición 70; y los cambios en las posiciones 342(C→T) y 491(C→A), descritos en cinco muestras (10,9%) pertenecientes a la rama Africana, que indujeron cambios de aminoácidos en los codones en posiciones 80 (Histidina a Tirosina) y 129 (Arginina a Lisina). Las mutaciones descritas en las ocho posiciones nucleotídicas restantes, no produjeron cambios de aminoácidos en la secuencia proteica.



**Tabla 4.16.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH18 en la región codificante de E6 de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Rama	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
			Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	%
E6	Af	251	T	C	F	-	49	Ts, S	5	10,9
	Af	266	G	A	V	-	54	Ts, S	5	10,9
	E	314	T	G	D	E	70	Tv, Ms	2	4,3
	Af	317	T	C	F	-	71	Ts, S	5	10,9
	Af	342	C	T	H	Y	80	Ts, Ms	5	10,9
	Af	374	G	A	L	-	90	Ts, S	5	10,9
	E	467	T	C	L	-	121	Ts, S	1	2,2
	E/Af	485	T	C	F	-	127	Ts, S	42	91,3
	Af	491	C	A	N	K	129	Tv, Ms	5	10,9
	Af	548	A	G	E	-	148	Ts, S	5	10,9
	E/Af	549	C	A	R	-	149	Tv, S	42	91,3

Af, Africana; E, Europea; Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa.

#### 4.3.2.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7

El estudio de los polimorfismos se llevo a cabo en la totalidad de la región que codifica la proteína E7 y nos permitió identificar tres patrones diferentes, cada uno de ellos asignado a una rama filogenética (Tabla 4.17).

En la rama Asiático-Amerindia se identificaron cuatro secuencias (8,7%) idénticas a la secuencia prototipo. En la rama Europea se describió el patrón denominado E-18-E7-1 que se observó en la mayoría de las muestras (82,6%), y presentó un único cambio, descrito en la bibliografía, en el nucleótido en posición 751(G→T). En la rama Africana se definió el patrón Af-18-E7-1, que fue compartido por cuatro muestras (8,7%), y que incluyó tres cambios en posiciones previamente descritas: 593(C→T), 640(C→T) y 864(A→G).

**Tabla 4.17.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E7 y frecuencia de los patrones en las 46 muestras de VPH18 analizadas.

Rama	Patrón	Secuencia VPH18 E7				Total	
		5	6	7	8	N	%
		9	4	5	6		
		4	0	2	4		
AsAi	Prototipo	C	C	G	A	4	8,7
E	E-18-E7-1	-	-	T	-	38	82,6
Af	Af-18-E7-1	T	T	-	G	4	8,7

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; Af, Africana; AsAi, Asiático-Amerindia; E, Europea.

En la tabla 4.18 se describen la frecuencia y las implicaciones a nivel proteico de las cuatro mutaciones observadas en la región codificante de E7. La mutación más frecuente (82,6%) correspondió a la transversión G→T en la posición nucleotídica 752, descrita en las

muestras pertenecientes a la línea Europea. Esta mutación dio lugar a una mutación silenciosa. El resto de cambios identificados en la región fueron transiciones en los nucleótidos en posiciones 594(C→T), 640(C→T) y 864(A→G) y en todos los casos fueron observados en secuencias asignadas a la rama Africana (8,7%). La mutación en la posición nucleotídica 594 produjo el cambio de Histidina a Tirosina en el aminoácido en posición 2; la mutación en el nucleótido en posición 640 fue una mutación silenciosa; y el cambio descrito en la posición nucleotídica 864 indujo un cambio de Lisina a Serina en el codón en posición 92.

La presencia de mutaciones con sentido fue mayor en la región codificante de E7 (50%) que en la región codificante de E6 (36,4%), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,6$ ).

**Tabla 4.18.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH18 en la región codificante de E7 de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Rama	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
			Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	%
E7	Af	594	C	T	H	Y	2	Ts, Ms	4	8,7
	Af	640	C	T	P	-	17	Ts, S	4	8,7
	E	752	G	T	A	-	54	Tv, S	38	82,6
	Af	864	A	G	K	S	92	Ts, Ms	4	8,7

Af, Africana; AsAi, Asiático-Amerindia; E, Europea; Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa.

#### 4.3.2.2.3. Polimorfismos en la región reguladora

El estudio de los polimorfismos de la región reguladora se llevó a cabo en 362 pb y nos permitió identificar 13 patrones además de la secuencia de referencia (Tabla 4.19). Cuatro de los patrones descritos pertenecían a variantes descritas por primera vez.

En la rama Asiático-Amerindia se observaron el patrón prototipo, y los patrones denominados AsAi-18-LCR-1 y AsAi-18-LCR-2. El patrón prototipo se observó en una única muestra (2,2%) y los patrones AsAi-18-LCR-1 y AsAi-18-LCR-2, se identificaron en dos (4,3%) y una muestra (2,2%), respectivamente. El primero presentó dos cambios en la posiciones 7592(T→C) y 7717(A→C); el segundo mostró un único cambio en la posición 7717(A→C).

**Tabla 4.19.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región reguladora estudiada y frecuencia de los patrones en las 46 muestras de VPH18 analizadas

Rama	Patrón	Secuencia VPH18 LCR																				Total	
		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	N	%
		4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	7	7	7	7		
		8	9	0	1	2	2	3	6	6	6	9	4	5	5	7	9	0	1	2	3		
		6	6	7	2	7*	9	0	3	4	7	2	3	1	8	0	9*	4	7	6	0		
AsAi	Prototipo	C	C	A	G	A	C	T	G	A	A	T	T	T	A	A	T	T	A	C	C	1	2,2
	AsAi-18-LCR-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	2	4,3
	AsAi-18-LCR-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	1	2,2
E	E-18-LCR-1	T	-	-	-	-	A	-	A	-	C	C	-	-	-	T	-	-	-	-	-	14	30,4
	E-18-LCR-2	-	-	-	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	T	-	-	-	-	-	8	17,4
	E-18-LCR-3	T	-	-	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	T	-	-	-	-	-	6	13
	E-18-LCR-4	T	-	-	-	-	-	-	A	-	C	C	-	-	-	T	-	-	-	-	-	4	8,7
	E-18-LCR-5	T	-	-	-	-	A	-	A	-	C	C	-	-	-	T	-	-	G	-	-	1	2,2
	E-18-LCR-6	-	-	-	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	T	-	-	C	-	-	1	2,2
	E-18-LCR-7	T	-	-	-	C	A	-	A	-	C	C	-	-	-	T	-	-	-	-	-	1	2,2
	E-18-LCR-8	T	-	-	-	-	A	-	A	-	C	C	-	-	-	T	G	-	G	-	-	1	2,2
	E-18-LCR-9	-	-	G	-	-	A	-	-	C	C	C	-	-	-	T	-	-	-	-	-	1	2,2
Af	Af-18-LCR-1	-	G	-	A	-	-	C	A	-	C	C	G	C	C	T	-	C	-	T	A	4	8,7
	Af-18-LCR-2	-	G	-	A	-	A	C	A	-	C	C	G	C	C	T	-	C	-	T	A	1	2,2

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez y en negrita patrones descritos por primera vez; Af, Africana; AsAi, Asiático-Amerindia; E, Europea.

En la rama Europea se describieron nueve patrones; cinco patrones incluían cambios en posiciones nucleotídicas que habían sido descritas previamente en la bibliografía y cuatro patrones se consideraron nuevos al incluir en la secuencia cambios en posiciones que hasta el momento no habían sido referidas. Todas las variantes pertenecientes a esta rama presentaban tres cambios en las posiciones nucleotídicas: 7567(A→C), 7592(T→C) y 7670(A→T). El patrón más frecuente en el total de muestras estudiadas fue E-18-LCR-1 (30,4%), que presentó los tres cambios comunes y tres cambios más en las posiciones nucleotídicas: 7486(C→T), 7529(C→A) y 7563(G→A). El segundo patrón más frecuente fue E-18-LCR-2, que se identificó en ocho secuencias (17,4%) e incluyó un cambio en la posición nucleotídica 7529(C→A) además de los tres cambios comunes. Los patrones E-18-LCR-3 y E-18-LCR-4 se observaron en seis (13%) y cuatro secuencias (8,7%) respectivamente, y ambos presentaron cinco cambios en la secuencia, incluyendo los tres cambios comunes, un cambio en la posición 7486(C→T) y cambios específicos de cada patrón en posiciones: 7529(C→A) en E-18-LCR-3 y 7563(G→A) en el patrón E-18-LCR-4. Cada uno de los patrones identificados como nuevos fueron detectados en una muestra clínica (2,2%) y fueron: E-18-LCR-5, E-18-LCR-6, E-18-LCR-7 y E-18-LCR-8. Las posiciones nucleotídicas que al incluir mutaciones definen estas nuevas variantes son: 7527(A→C); 7699(T→G) y 7717(A→G/C). Esta última posición no se describe por primera vez, pero sólo se había observado en las variantes pertenecientes a la rama Asiático-Amerindia. El patrón denominado E-18-LCR-9

se observó en una secuencia (2,2%) y presentó cambios en seis posiciones, las tres posiciones comunes y las posiciones 7507(A→G), 7529(C→A) y 7564(A→C).

En la rama Africana, se describieron dos patrones: Af-18-LCR-1 y Af-18-LCR-2. El patrón 1, se identificó en cuatro muestras (8,7%) y presentó 13 cambios en la secuencia con respecto a la secuencia prototipo en posiciones nucleotídicas ya descritas. El patrón 2 de la rama se identificó en una secuencia (2,2%), y presentó los mismos cambios que el patrón anterior más un cambio adicional en la posición nucleotídica 7529(C→A).

Las sustituciones de bases descritas en la región reguladora, los sitios de unión a factores de transcripción alterados y la frecuencia de los cambios se muestran en la **tabla 4.20**. Del total de 20 posiciones nucleotídicas con cambio descritas, seis de ellas afectaron a sitios de unión para factores de transcripción.

**Tabla 4.20.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH18 en la región reguladora estudiada de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, sitio de unión, y tipo de mutación.

Región	Rama	Posición nucleótido	Nucleótido Prototipo	Nucleótido Variante	Sitio de unión	Tipo de mutación	Total N	%
LCR	E	7486	C	T	-	Ts	27	58,7
	Af	7496	C	G	-	Tv	5	10,9
	E	7507	A	G	-	Ts	1	2,2
	Af	7512	G	A	-	Ts	5	10,9
	E	7527	A	C	C/EBP, Oct-1	Tv	1	2,2
	E/Af	7529	C	A	-	Tv	34	73,9
	Af	7530	T	C	-	Ts	5	10,9
	E/Af	7563	G	A	-	Ts	26	56,5
	E	7564	A	C	-	Tv	1	2,2
	E/Af	7567	A	C	-	Tv	42	91,3
	AsAi/E/Af	7592	T	C	-	Ts	44	95,7
	Af	7643	T	G	-	Tv	5	10,9
	Af	7651	T	C	KRF-1	Ts	5	10,9
	Af	7658	A	C	Oct-1	Tv	5	10,9
	E/Af	7670	A	T	-	Tv	42	91,3
	E	7699	T	G	YY-1, TEF-1	Tv	1	2,2
	Af	7704	T	C	-	Ts	5	10,9
	AsAi/E	7717	A	C/G	-	Tv/Ts	6	13,0
	Af	7726	C	T	TEF-1, Oct-1	Ts	5	10,9
	Af	7730	C	A	TEF-1, Oct-1	Tv	5	10,9

Af, Africana; AsAi, Asiático-Amerindia; E, Europea; Ts, transición; Tv, transversión; C/EBP, proteína de unión al potenciador CCAAT; KRF-1, sitio de unión del factor específico de queratinocitos 1; YY-1, Factor ying-yang 1; TEF-1, potenciador de transcripción del factor 1; Oct-1, octámero de unión para el factor 1.

La posición nucleotídica 7527 descrita por primera vez, alteró los sitios de unión de la proteína de unión al potenciador CCAAT (C/EBP, *CCAAT Enhancer Binding Protein*) y Oct-1, la transición T→C en la posición nucleotídica 7651, afectó al sitio de unión del factor específico de queratinocitos 1 (KRF-1, *Keratinocyte Specific Transcription Factor*); la

transversión A→C en posición 7658 afectó al factor Oct-1; la transversión T→G en la posición nucleotídica 7699 alteró los sitios de unión de los factores YY-1 y TEF-1; y cambios en las posiciones 7726 y 7730 alteran los sitios de unión de los factores de transcripción TEF-1 y Oct-1. Todos los cambios anteriormente descritos fueron identificados en secuencias asignadas a la rama Africana, con la excepción de los nuevos cambios en las posiciones nucleotídicas 7527 y 7699, que sólo se observaron en secuencias asignadas a la rama Europea. La sustitución descrita con más frecuencia (95,7%) fue la transición T→C en el nucleótido en posición 7592 que se identificó en muestras asignadas a las tres ramas filogenéticas; y le siguieron con una frecuencia del 91,3%, las transversiones A→C y A→T en los nucleótidos en posiciones 7567 y 7670, respectivamente.

#### 4.3.2.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7 y en la región reguladora

En el análisis de las secuencias de las muestras infectadas por VPH18 no se localizaron inserciones o deleciones. Las variantes de la región codificante de E6 presentaron un mínimo de dos (0,4%) y un máximo de nueve cambios de nucleótidos (1,9%) con respecto a la secuencia de referencia; en la región codificante de E7 las variantes observadas mostraron un máximo de tres cambios de nucleótidos (0,9%); y en la región reguladora se identificaron variantes que incluyeron hasta catorce cambios de nucleótidos (3,4%) en los 362 pb estudiados. El número medio de sitios con variación fue de tres sitios en la región codificante de E6 (media de  $3,4 \pm 3,4$ ; rango 0-9 mutaciones;  $p = 0,2$ ), de un sitio en la región codificante de E7 (media de  $1,3 \pm 1,5$ ; rango 0-3 mutaciones;  $p = 1,0$ ) y de seis para la región reguladora (media de  $5,8 \pm 4$ ; rango 0-14 mutaciones;  $p < 0,001$ ).

La variabilidad genética total fue significativamente mayor en el fragmento de la región reguladora estudiada que en los oncogenes virales, ya que se observaron 20 sitios con variación de nucleótidos (5,5%), frente a once sitios con variación de la región codificante de E6 (2,3%;  $p < 0,05$ ) y cuatro cambios de nucleótidos de la región codificante de E7 (1,3%;  $p < 0,05$ ). En las regiones E6 y E7 sin embargo, la variabilidad genética fue equivalente ( $p = 0,5$ ).

Todas las posiciones nucleotídicas con cambio que se observaron en las regiones estudiadas fueron compartidas entre las secuencias con algunas excepciones; en la región codificante de E6 la posición nucleotídica 467; y en la región reguladora las posiciones nucleotídicas: 7507, 7527, 7564, 7699.

#### 4.3.2.4. Distribución de variantes de VPH18 entre los pacientes

La distribución de los patrones descritos en las tres regiones de genoma en el total de muestras infectadas por VPH18, se muestra en la **tabla 4.21**. Las 46 muestras analizadas en

este trabajo se distribuyeron: tres muestras en la rama Asiático-Amerindia (6,5%), 36 muestras en la rama Europea (78,3%), cuatro muestras en la rama Africana (8,7%) y tres muestras clasificadas como recombinantes (6,5%). Se identificaron seis variantes nuevas en la rama Europea.

De las tres muestras asignadas a la rama Asiático-Amerindia, ninguna de ellas presentó la secuencia prototipo en las tres regiones estudiadas, y las dos variantes que se identificaron en la rama, presentaron únicamente cambios en la región reguladora.

La mayoría de las muestras infectadas por VPH18 se asignaron a la rama Europea, siendo la variante representada por la secuencia SP5876 la más frecuente, al identificarse en 13 muestras (28,3%). Le siguieron las variantes representadas por la secuencia SP3418 (15,2%), la secuencia SP4438 (10,9%) y la secuencia SP6015 (8,7%). El resto de variantes incluidas esta rama se identificaron en una única muestra clínica (2,2%). Todas las variantes se definieron con una serie de cambios característicos en posiciones concretas de las regiones estudiadas que incluyeron: en la región codificante de E6 las posiciones nucleotídicas 485 y 549; en la región codificante de E7 un cambio único en la posición nucleotídica 751, y en la región reguladora las posiciones nucleotídicas 7567, 7592 y 7670. Sólo en dos variantes pertenecientes a la rama Europea, representadas como SP5126 y SP6270, se produjeron cambios de aminoácidos (D→E) en la secuencia que codifica para la proteína E6, como consecuencia de la mutación observada en el nucleótido en posición 314. En la región codificante de E7, la mutación observada en las variantes no indujeron cambios de aminoácidos; y en la región reguladora de los cambios observados las mutaciones descritas por primera vez en las posiciones nucleotídicas 7527y 7699 alteran los sitios de unión de los factores de transcripción C/EBP, Oct-1, YY1 y TEF-1. Las seis variantes nuevas de VPH18 se describieron en esta rama, de acuerdo con la presencia de algún cambio en posiciones nucleotídicas no descritas previamente en la bibliografía. Fueron las representadas por las secuencias: SP4286, SP5289, SP3754, SP5126, SP6270 y SP6268, y en todos los casos se observaron en una muestra (2,2%). Las variantes SP4286, SP5289, SP3754 fueron iguales entre ellas en las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7, por lo que sólo se diferenciaron en cambios de la región reguladora.

**Tabla 4.21.** Asignación de variantes para cada rama filogenética en función de los patrones identificados en cada región genómica analizada y frecuencia de las mismas para los 46 aislados de VPH18 estudiados.

Rama	Secuencia representativa	*										*										*										n	w <sub>0</sub>	Total (N=46)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
		Patron I6					Patron E7					Patron ICR					Patron ICR					Patron ICR																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
AsAi	SP6148	Prototipo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Las variantes SP5126, SP6270 y SP6268 se caracterizaron con un cambio nuevo en la región codificante de E6 en las posiciones nucleotídicas 314 y 467, y en el caso de la variante SP6270 además, el cambio en la posición nucleotídica 7699 de la región reguladora.

De las cuatro muestras asignadas a la rama Africana, la variante representada por la secuencia SP5813 incluyó el mayor número de muestras (6,5%). Las variantes de esta rama incluyeron el mayor número de posiciones nucleotídicas con cambio descritas entre las variantes de VPH18. Las secuencias de la región codificante de E6 incluyeron nueve cambios de nucleótidos que dieron lugar a dos cambios de aminoácidos; las secuencias de la región codificante E7 presentaron tres cambios de nucleótidos que causaron dos cambios de aminoácidos; y en la región reguladora las variantes identificadas presentaron 13 y 14 cambios con respecto a la secuencia de referencia, que alteraron los sitios de unión de los factores de transcripción: KRF-1, Oct-1 y TEF-1. Las variantes de esta rama fueron idénticas en las tres regiones analizadas con la excepción de un cambio en la posición nucleotídica 7529 en la región reguladora, que se observó sólo en la variante representada por la secuencia SP3249.

Las tres muestras representadas por las secuencias SP5627, SP6340 y SP5227 fueron consideradas variantes recombinantes de VPH18 debido a que no se asignaron en la misma rama filogenética en las tres regiones estudiadas. La variante SP5627 no presentó cambios en las secuencias de las regiones codificantes de E6 y E7, y en la región reguladora su secuencia presentó los cambios descritos en las variantes de la rama Europea. En la variante SP6340 los dos cambios que se observaron en las secuencias de las regiones codificantes correspondieron a variantes de la rama Europea, mientras que la secuencia de la región reguladora no presentó ninguna variación con respecto a la secuencia de referencia. La variante SP5227 presentó en la región codificante de E6 y en la región reguladora, cambios incluidos en las variantes asignadas a la rama Africana, y en la región codificante de E7 presentó un único cambio en la posición 751, característico de las variantes pertenecientes a la rama Europea.

#### 4.3.2.5. Distribución de variantes de VPH18 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes

La distribución global de las variantes de VPH18 identificadas de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes (**Tabla 4.22**), se llevó a cabo comparando variantes Europeas y no Europeas, al agrupar las variantes asignadas a las ramas Asiático-Amerindia y Africana con el fin de aumentar la potencia estadística. En el análisis de las variantes identificadas de acuerdo al estatus VIH-1 de los pacientes, se descartaron dos



pacientes con estatus VIH-1 desconocido, incluyéndose 18 pacientes no infectados por VIH-1 y 23 pacientes infectados por VIH-1. De acuerdo al origen geográfico, se analizaron 26 hombres españoles y doce hombres procedentes de países latinoamericanos. Dada la escasa representación de pacientes procedentes de otros países europeos (N = 4) y de América del Norte (N = 1), estos hombres fueron excluidos del análisis. En ambos análisis no se tuvieron en cuenta las tres variantes recombinantes de VPH18.

Como se indica en la tabla, cuando se compara la distribución de variantes de acuerdo al estatus VIH-1, tanto en los pacientes infectados como no infectados por VIH-1, las variantes Europeas fueron las más prevalentes, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución. La prevalencia de las variantes Europeas fue superior tanto en hombres españoles como en latinoamericanos. Sin embargo, el análisis univariado llevado a cabo, indicó que ser un hombre latinoamericano está asociado con una prevalencia entre siete y ocho veces mayor de estar infectado con una variante asignada a una rama no europea (OR 8,6; IC95%:1,3-54,1).

**Tabla 4.22.** Prevalencia y análisis univariado de las variantes asignadas a las ramas Europea y no Europeas de VPH18 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.

	Total	Prevalencia		p-valor	OR (IC95%)
	N (%)	Variantes Europeas N (%)	Variantes No Europeas N (%)		
<b>Estatus VIH-1</b>	<b>41</b>				
Negativo	18 (100)	14 (77,8)	4 (22,2)	0,4399	1
Positivo	23 (100)	20 (86,9)	3 (13)		0,52 (0,10-2,72)
<b>Origen geográfico</b>	<b>38</b>				
España	26 (100)	24 (92,3)	2 (7,7)	0,0151	1
Latinoamérica	12 (100)	7 (58,3)	5 (41,7)		8,57(1,35-54,15)

### 4.3.3. Análisis de variantes de VPH31

El análisis de polimorfismos de las secuencias de nucleótidos se realizó en las 29 muestras en las que se detectó la presencia de ADN de VPH31. La asignación de variantes se basó en la comparación con la secuencia de referencia descrita en el año 1989 por Goldsborough *et al.* En el caso de los tipos 16 y 18, se ha llevado a cabo el análisis comparativo del genoma de VPH con colecciones de muestras procedentes de diferentes regiones del mundo, lo que ha permitido, mediante el análisis de sus relaciones filogenéticas, la asignación a ramas características de ciertas regiones geográficas. En el resto de tipos de VPH no se ha llevado a cabo este análisis filogenético aún, por tanto las diferentes variantes que se identificaron en este trabajo para VPH31, VPH33 y VPH52, no se asignaron en ramas y/o clases descritas previamente, y sólo se clasificaron como secuencias prototipo o no prototipo. Al igual que en VPH16 y VPH18, las diferentes variantes se han denominado mediante el nombre de una secuencia representativa de todas las muestras que presentaban la misma secuencia.

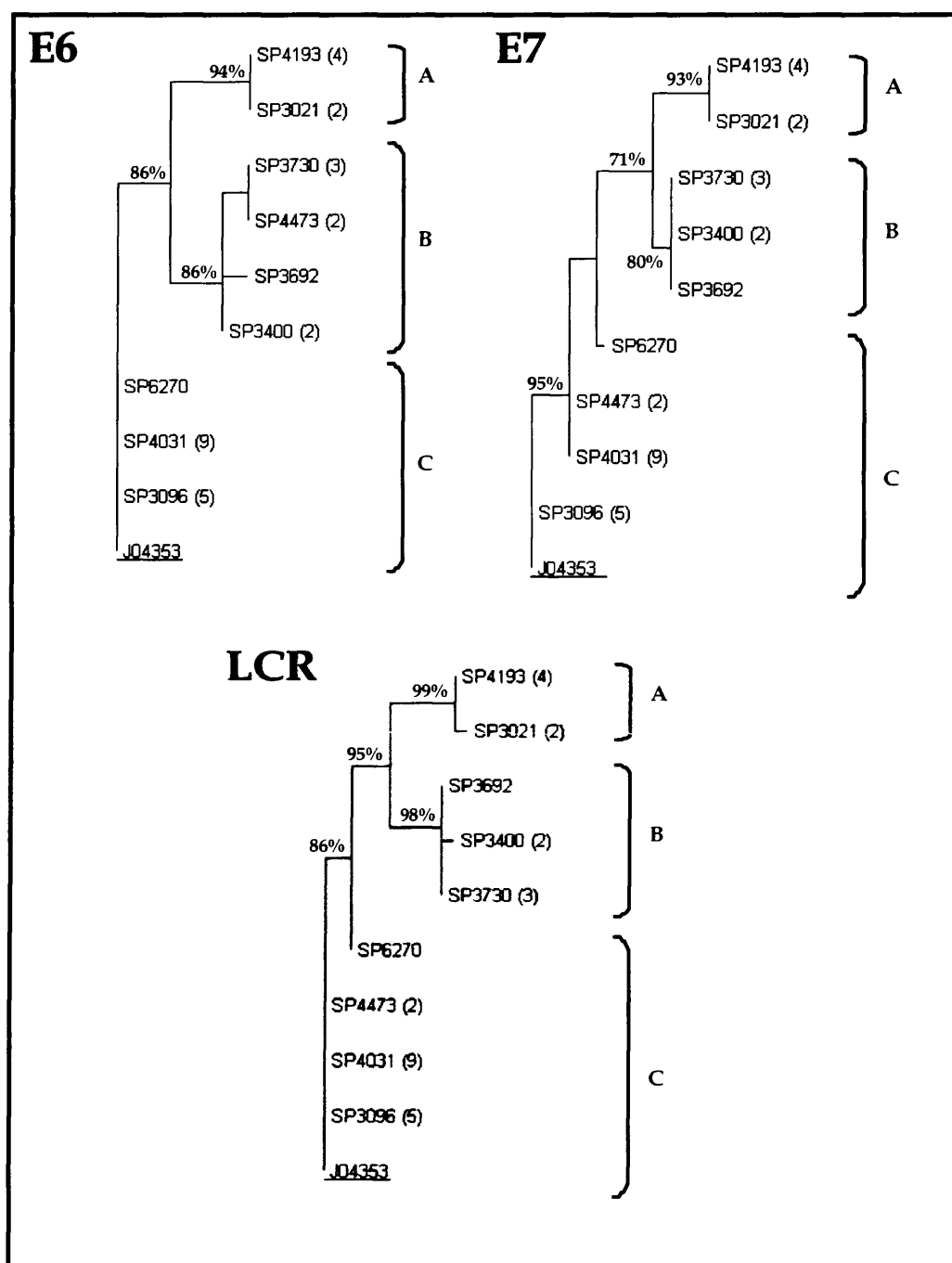
#### 4.3.3.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH31

En las 29 muestras analizadas, se identificaron nueve secuencias representativas que incluyeron la secuencia prototipo y ocho variantes. La secuencia SP3096 representó cinco muestras que fueron idénticas a la secuencia prototipo, la secuencia SP4031 representó nueve muestras, SP6270 incluyó una muestra, SP4473 representó dos muestras, SP3021 dos muestras, SP4193 incluyó cuatro muestras idénticas, SP3730 fue la representante de tres muestras, SP3692 para una muestra y SP3400 incluyó dos muestras.

Los fenogramas obtenidos del análisis filogenético de cada una de las regiones estudiadas se indican en la **figura 4.4**.

La filogenia de las regiones codificantes de E6 y E7 y la región reguladora LCR nos permitió distinguir tres posibles ramas o *clusters* con valores de *bootstrap* significativos (mayores del 70%). La asignación de las diferentes secuencias representativas de las muestras clínicas analizadas, a las tres ramas observadas, fue igual en las tres regiones del genoma, con la excepción de la secuencia SP4473. La rama denominada A incluía las secuencias representativas SP4193 y SP3021, con valores de *bootstrap* del 94%, 93% y 99% en las regiones codificantes de E6, E7 y reguladora, respectivamente. La rama nombrada B, incluyó en las regiones codificante de la proteína E7 y reguladora, tres secuencias representativas (SP3730, SP3400, y SP3692) y en la región codificante de la proteína E6 cuatro secuencias, las tres descritas anteriormente y la secuencia SP4473. La rama llamada C

en las tres regiones del genoma analizadas incluyó el resto de las secuencias del presente estudio y la secuencia de referencia o prototipo.



**Figura 4.4.** Análisis filogenético de las 29 muestras caracterizadas como VPH31 en las regiones codificantes de E6, E7 y la región reguladora (LCR). J04353, secuencia de referencia de VPH31 (Goldsborough *et al.*, 1989). Entre paréntesis se indica el número de muestras que comparten la misma secuencia y que han sido simbolizadas por la secuencia representativa. Los números situados en las ramas indican los valores de *bootstrap* mayores del 70%.

#### 4.3.3.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH31

La designación de los patrones identificados en cada región se denominó con el genotipo de VPH-la región estudiada-número de patrón identificado en orden descendente de frecuencia.

##### 4.3.3.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6

El análisis de polimorfismos en la totalidad de la región codificante se indica en la **tabla 4.23**. Se identificaron cuatro patrones además del patrón de la secuencia prototipo, con cambios en posiciones nucleotídicas descritas con anterioridad en la bibliografía.

La mayoría de las muestras se asignaron a la secuencia prototipo (51,7%), y le siguió en frecuencia el patrón denominado 31-E6-1 (20,7%). Este patrón presentó cinco cambios en las posiciones nucleotídicas: 285(C→T), 320(A→T), 404(G→A), 428(A→G) y 520(C→T). El patrón 31-E6-2 fue identificado en cinco secuencias (17,2%) y se definió igualmente con cinco cambios, aunque en las posiciones nucleotídicas: 248(T→C), 297(A→G), 320(A→T), 475(A→G) y 520(C→T). El patrón 31-E6-3 se observó en dos muestras (6,7%) y presentó los mismos cambios que el patrón 31-E6-2, con la excepción del cambio en la posición 248(T→C). El patrón 31-E6-4 se observó en una muestra (3,4%) y presentó cinco cambios iguales a los que definieron el patrón 31-E6-2, con la única diferencia de la posición 261(A→C).

**Tabla 4.23.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E6 y frecuencia de los patrones en las 29 muestras de VPH31 analizadas.

Patrón	Secuencia VPH31 E6										Total	
	2	2	2	2	3	4	4	4	5			
	4	6	8	9	2	0	2	7	2			
	8	1	5	7	0	4	8	5	0	N	%	
Prototipo	T	A	C	A	A	G	A	A	C	15	51,7	
31-E6-1	-	-	T	-	T	A	G	-	T	6	20,7	
31-E6-2	C	-	-	G	T	-	-	G	T	5	17,2	
31-E6-3	-	-	-	G	T	-	-	G	T	2	6,7	
31-E6-4	-	C	-	G	T	-	-	G	T	1	3,4	

Los números verticales describen la posición nucleotídica;  
(-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo.

En la **tabla 4.24** se indican los cambios nucleotídicos y proteicos en la región codificante de E6, así como la frecuencia de los mismos. Las variaciones observadas con más frecuencia entre las muestras (48,3%) fueron las correspondientes a la transversión A→T en el nucleótido en la posición 320, y la transición C→T en el nucleótido en posición 520. La mutación en posición 320 es una mutación silenciosa; y la mutación en el nucleótido 520,

indujo un cambio de Alanina a Valina, ambos aminoácidos neutros, en el codón en posición 138. Seguidas en frecuencia (27,6%) se describieron las transiciones en las posiciones nucleotídicas 297(A→G) y 475(A→G), que en ambos casos implicaron cambio de aminoácido. La primera en el codón 64, con un cambio de Treonina a Alanina, y la segunda en el codón 123, con un cambio de Lisina a Arginina. Los cambios descritos en las posiciones nucleotídicas 248(T→C), 404(G→A) y 428(A→G) son considerados mutaciones silenciosas por no inducir cambio de aminoácido. La transición de C a T en la posición 285, se observó en seis muestras (20,7%) e induce un cambio de Histidina a Tirosina en el codón 60. La transversión A→C en la posición 261, sólo se presentó en una muestra (3,4%) y dio lugar a cambio de Isoleucina a Leucina en el codón 52.

**Tabla 4.24.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH31 en la región codificante de E6 de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
		Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	(%)
E6	248	T	C	F	-	47	Ts, S	5	17,2
	261	A	C	I	L	52	Tv, Ms	1	3,4
	285	C	T	H	Y	60	Ts, Ms	6	20,7
	297	A	G	T	A	64	Ts, Ms	8	27,6
	320	A	T	S	-	71	Tv, S	14	48,3
	404	G	A	L	-	99	Ts, S	6	20,7
	428	A	G	Q	-	107	Ts, S	6	20,7
	475	A	G	K	R	123	Ts, Ms	8	27,6
	520	C	T	A	V	138	Ts, Ms	14	48,3

Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa

#### 4.3.3.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7

El estudio de la secuencia completa de la región codificante de E7, permitió definir cinco patrones, indicados en la **tabla 4.25**. De la misma forma que en la región codificante de E6, las posiciones nucleotídicas con mutación ya habían sido descritas en la bibliografía.

El patrón mayoritario fue 31-E7-1, que se identificó en once muestras (37,9%) e incluyó un cambio único en la posición nucleotídica 743(A→G). Con la misma frecuencia (20,7%) se identificaron los patrones 31-E7-2 y 31-E7-3 que contenían tres cambios comunes en las posiciones nucleotídicas 670, 695 y 743, y un cambio específico en el nucleótido en la posición 626, en el patrón 31-E7-3. La secuencia prototipo se presentó en cinco muestras (17,2%); y el patrón 31-E7-4 (4,2%) que se definió con dos cambios en las posiciones nucleotídicas 626(C→T) y 743(A→G), se identificó en una secuencia (3,4%).

**Tabla 4.25.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E7 y frecuencia de patrones en las 29 muestras de VPH31 analizadas.

Patron	Secuencia VPH31 E7				Total	
	6	6	6	7	N	%
	2	7	9	4		
	6	0	5	3		
Prototipo	C	C	G	A	5	17,2
31-E7-1	-	-	-	G	11	37,9
31-E7-2	-	T	A	G	6	20,7
31-E7-3	T	T	A	G	6	20,7
31-E7-4	T	-	-	G	1	3,4

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo.

Las mutaciones identificadas en la región codificante de E7 y la frecuencia de las mismas se indican en la **tabla 4.26**. El cambio más importante, al observarse en todos los patrones, correspondió a la transición A→G en la posición 743, e indujo el cambio de un aminoácido básico (Lisina) a un aminoácido ácido (Ácido Glutámico) en el codón 62. Le siguieron con una frecuencia del 41,4%, las transiciones C→T y G→A en las posiciones nucleotídicas 670 y 695 respectivamente; la primera dio lugar a una mutación silenciosa y la segunda indujo el cambio de Ácido Glutámico a Lisina. Por último, la transición C→T en el nucleótido 626 que se identificó en siete muestras (24,1%), indujo el cambio de Histidina a Tirosina en el codón 23.

Aunque la presencia de mutaciones con cambio de aminoácido fue mayor en la región codificante de E7 (75%) que en la región codificante de E6 (55,5%), estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p = 0,9$ ).

**Tabla 4.26.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH31 en la región codificante de E7 de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
		Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	(%)
E7	626	C	T	H	Y	23	Ts, Ms	7	24,1
	670	C	T	V	-	37	Ts, S	12	41,4
	695	G	A	E	K	46	Ts, Ms	12	41,4
	743	A	G	K	E	62	Ts, Ms	24	82,8

Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa.

#### 4.3.3.2.3. Polimorfismos en la región reguladora

El análisis de 433 pb en la región reguladora, nos permitió identificar cuatro patrones además de la secuencia de referencia (**Tabla 4.27**).

La secuencia prototipo fue la más frecuente al localizarse en 17 muestras (58,6%), seguida de los patrones 31-LCR-1 y 31-LCR-2 que se presentaron con la misma frecuencia (13,8%). El patrón 31-LCR-1 se definió con diez cambios en las posiciones nucleotídicas: 7449(G→A), 7457(G→A), 7474(C→T), 7515(C→A), 7525(G→A), 7533(C→T), 7575(T→C), 7642(C→A), 7707(A→G) y 7749(A→C), y el patrón 31-LCR-2 presentó nueve cambios en las posiciones: 7449(G→A), 7450(A→C), 7457(G→A), 7474(C→T), 7506(C→T), 7525(G→A), 7575(T→C), 7710(C→T) y 7754(C→A). El patrón 31-LCR-3, identificado en dos muestras (6,9%), presentó los mismos cambios que el patrón 31-LCR-1 y uno más en la posición nucleotídica 7659(T→G), siendo el patrón más divergente con respecto a la secuencia prototipo al presentar once cambios. El patrón 31-LCR-4, observado en dos secuencias (6,9%), presentó los mismos cambios que el patrón 31-LCR-2 y un cambio adicional localizado en el nucleótido 7534(C→T) no descrito anteriormente, de forma que fue considerado nuevo.

**Tabla 4.27.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región reguladora estudiada y frecuencia de los patrones en las 29 muestras de VPH31 analizadas.

Patrón	Secuencia VPH 31 LCR																Total	
	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7		
	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	6	6	7	7	7	7		
	4	5	5	7	0	1	2	3	3	7	4	5	0	1	4	5		
	9	0	7	4	6	5	5	3	4*	5	2	9	7	0	9	4	N	%
Prototipo	G	A	G	C	C	C	G	T	C	T	C	T	A	C	A	C	17	58,6
31-LCR-1	A	-	A	T	-	A	A	C	-	C	A	-	G	-	C	-	4	13,8
31-LCR-2	A	C	A	T	T	-	A	-	-	C	-	-	-	T	-	A	4	13,8
31-LCR-3	A	-	A	T	-	A	A	C	-	C	A	G	G	-	C	-	2	6,9
<b>31-LCR-4</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>-</b>	<b>A</b>	<b>-</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>T</b>	<b>-</b>	<b>A</b>	<b>2</b>	<b>6,9</b>

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez y en negrita patrones descritos por primera vez.

En esta región se identificaron un total de 16 mutaciones en la secuencia de nucleótidos, que se indican en la **tabla 4.28**. Las mutaciones que podían afectar a sitios de unión para factores de transcripción incluyeron las transiciones en las posiciones nucleotídicas: 7449(G→A), 7474(C→T), 7534(C→T) y la transversión en el nucleótido 7659(T→G). Las transiciones en las posición 7449 y la descrita por primera vez 7534, dan lugar a la alteración de un sitio de unión de la región determinante del sexo, cromosoma Y (SRY, *Sex Determining Región Y*); la transición en la posición 7474 se asoció con un cambio en un sitio de unión de la proteína viral E2; y la mutación en posición 7659 afectó a un sitio de unión de C/EBP y la proteína SRY. Estos cambios se identificaron en el 41,4% de las

muestras estudiadas, excepto los detectados en las posiciones 7534 y 7659 que se identificaron en el 6,9% de las muestras estudiadas. El resto de mutaciones observadas en esta región, no se asocian con alteraciones en sitios de unión de factores de transcripción; y las más frecuentes (41,4%) fueron las que incluyeron las posiciones nucleotídicas 7457, 7525, 7575 y 7642.

**Tabla 4.28.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH31 en la región reguladora estudiada de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, sitio de unión, y tipo de mutación.

Región	Posición nucleótido	Nucleótido		Sitio de unión	Tipo de mutación	Total	
		Prototipo	Variante			N	(%)
LCR	7449	G	A	SRY	Ts	12	41,4
	7450	A	C	-	Tv	6	20,7
	7457	G	A	-	Ts	12	41,4
	7474	C	T	E2	Ts	12	41,4
	7506	C	T	-	Ts	6	20,7
	7515	C	A	-	Tv	6	20,7
	7525	G	A	-	Ts	12	41,4
	7533	T	C	-	Ts	6	20,7
	7534	C	T	SRY	Ts	2	6,9
	7575	T	C	-	Ts	12	41,4
	7642	C	A	-	Tv	12	41,4
	7659	T	G	SRY, C/EBP	Tv	2	6,9
	7707	A	G	-	Ts	6	20,7
	7710	C	T	-	Ts	6	20,7
	7749	A	C	-	Tv	6	20,7
	7754	C	A	-	Tv	6	20,7

Ts, transición; Tv, transversión; SRY, Región determinante del sexo del cromosoma Y; E2, proteína viral E2; C/EBP, proteína de unión al potenciador CCAAT.

#### 4.3.3.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7 y en la región reguladora

En las secuencias analizadas no se localizaron deleciones o inserciones. Las variantes de la región codificante de E6 observadas en este trabajo presentaron un mínimo de cuatro cambios (0,9%) y un máximo de cinco cambios de nucleótidos (1,1%) con respecto a la secuencia de referencia; en la región codificante de E7, las variantes se definieron con un mínimo de un cambio de nucleótido (0,3%) hasta un máximo de cuatro cambios de nucleótidos (1,3%), y en la región reguladora se definieron variantes que presentaron entre nueve (2,1%) y once cambios de nucleótidos (2,5%). En las variantes, la media más baja de variaciones puntuales con respecto a la prototipo fue la región codificante de E7 (media de  $2 \pm 1,6$ ; rango 0-4 mutaciones;  $p = 0,4$ ); seguida de la región codificante de E6 (media de  $3,8 \pm$



3,2; rango 0-5 mutaciones;  $p = 0,05$ ) y en último lugar la región reguladora (media de  $8 \pm 4,5$ ; rango 0-11 mutaciones;  $p < 0,05$ ).

La variabilidad genética total de la región codificante de E6 con respecto a la región de reguladora fue menor, al describirse nueve posiciones con cambio (2%) frente a 16 posiciones con cambios (3,7%) en el total de pares de bases analizadas para cada región ( $p = 0,19$ ). En la región codificante de E7 y con respecto a la región reguladora, la variabilidad fue también menor, al presentarse cuatro cambios en 296 pb ( $p = 0,09$ ). La variabilidad genética en las regiones codificantes de E6 y E7 fue equivalente ( $p = 0,7$ ).

En el análisis de los polimorfismos de tres regiones, todas las mutaciones identificadas en las secuencias fueron compartidas por otras secuencias, con la excepción de la posición nucleotídica 261.

#### 4.3.3.4. Distribución de variantes de VPH31 entre los pacientes

En la **tabla 4.29** se indican las variantes identificadas en las 29 muestras infectadas por VPH31; cinco muestras representadas por la secuencia SP3096 fueron clasificadas como prototipo en las tres regiones estudiadas (17,2%); y 24 muestras fueron clasificadas como variantes no prototipo (82,8%).

La variante representada por la secuencia SP4031 fue la más prevalente (31%), e incluía un cambio único en la región codificante de E7. La variante representada por la secuencia SP4193 se observó en cuatro muestras (13,8%), la variante representada por la secuencia SP3730 en tres muestras (10,3%); las variantes representadas por las secuencias SP4473, SP3400 y SP3021 se identificaron cada una en dos muestras (6,9%) y las variantes representadas por las secuencias SP3692 y SP6270 en una muestra (3,4%). Las variantes SP3021 y SP4193 fueron iguales en las tres regiones analizadas con la excepción de un cambio adicional descrito en la posición nucleotídica 7659 de la región reguladora en la variante SP3021, que afectó al sitio de unión del factor de transcripción C/EBP y la proteína SRY. De la misma forma, las variantes representadas por las secuencias SP3692 y SP3730 fueron iguales con la excepción de un cambio en la región codificante de E6, en posición nucleotídica 261 en las muestras con la secuencia SP3692, y en posición 248 en la variante representada por la secuencia SP3730. En las muestras estudiadas sólo se describió una variante nueva: SP3400; debido a la presencia de una mutación en el nucleótido 7534 de la región reguladora, no descrita previamente y que produjo la alteración en el sitios de unión de la proteína SRY.

**Tabla 4.29.** Asignación de variantes para cada rama filogenética en función de los patrones identificados en cada región genómica analizada y frecuencia de las mismas para los 29 aislados de VPH31 estudiados.

Secuencia representativa	Patron E6										Patron E7										Patron LCR										n	9/10	Total (N=29)																
	Prototipo	Prototipo	Prototipo	31-E6-3	31-E6-4	31-E6-2	31-E6-2	31-E6-1	31-E6-1	Prototipo	31-E7-1	31-E7-4	31-E7-3	31-E7-3	31-E7-1	31-E7-3	31-E7-2	31-E7-2	Prototipo	Prototipo	Prototipo	31-LCR-4	31-LCR-2	Prototipo	31-LCR-2	31-LCR-3	31-LCR-1																						
SP3096	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	17/2																			
SP4031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	31																			
SP6270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3/4																			
SP3400	-	-	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	A	T	-	T	-	2	6/9																		
SP3692	-	C	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	A	T	-	T	-	1	3/4																		
SP4473	C	-	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	-	-	-	-	2	6/9																			
SP3730	C	-	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	G	T	-	A	T	-	T	-	3	10/3																		
SP3021	-	-	T	-	T	A	G	-	T	-	31-E7-2	-	T	A	G	-	T	A	G	-	T	A	G	-	A	-	A	T	-	2	6/9																		
SP4193	-	-	T	-	T	A	G	-	T	-	31-E7-2	-	T	A	G	-	T	A	G	-	T	A	G	-	A	-	A	T	-	4	13/8																		
										SRY										E2										SRY										SRY/C-EBP									
										I										H										E										K									
										↓										↓										↓										↓									
										L										Y										K										E									

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez. En la parte inferior de las posiciones de nucleótidos con mutaciones se indican los cambios de aminoácidos (regiones E6 y E7) y los sitios de unión de factores de transcripción alterados (LCR). Se indican en negrita las variantes y patrones no descritos hasta el momento.

En las variantes no prototipo descritas en este trabajo, se observaron una serie de posiciones nucleotídicas con cambios comunes a todas. En la región codificante de E6 fueron las posiciones nucleotídicas 320 y 520, aunque sólo esta última produjo un cambio de Alanina a Triptófano; en la región codificante de E7 fue la posición 743 que dio lugar al cambio de Lisina a Ácido Glutámico; y en la región reguladora fueron cinco las posiciones nucleotídicas características (7449, 7457, 7474, 7525 y 7575), aunque sólo los cambios en 7449, 7474 y 7534 afectaron a los sitios de unión del factor de transcripción SRY y de la proteína viral E2, respectivamente. Las variantes de VPH31 descritas en este trabajo presentaron entre dos y cuatro cambios de aminoácidos en la región codificante de E6; dos y tres cambios en la región codificante de E7; y en la región reguladora se alteraron los sitios de unión de dos y tres factores de transcripción, como se ha descrito anteriormente.

#### 4.3.3.5. Distribución de variantes de VPH31 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes

En la **tabla 4.30** se muestra la distribución global de las variantes de VPH31, asignadas como prototipo o no prototipo, de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes. El análisis de las variantes se llevó a cabo en 16 pacientes infectados por VIH-1 y once pacientes no infectados por VIH-1; dos pacientes en los que no se tenían datos de la infección fueron excluidos del análisis. De acuerdo con el origen geográfico de los hombres incluidos en el estudio, 22 eran españoles y seis procedían de países latinoamericanos. Un paciente de origen europeo distinto al español, fue excluido del análisis.

**Tabla 4.30.** Prevalencia y análisis univariable de las variantes asignadas como prototipo y no prototipo de VPH31 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.

	Total	Prevalencia		p-valor	OR (IC95%)
	N (%)	Variantes prototipo N (%)	Variantes no prototipo N (%)		
<b>Estatus VIH-1</b>	<b>27</b>				
Negativo	11 (100)	3 (27,3)	8 (72,7)	0,3356	1
Positivo	16 (100)	2 (12,5)	14 (87,5)		2,62 (0,35-19,18)
<b>Origen geográfico</b>	<b>28</b>				
España	22 (100)	4 (18,2)	18 (81,8)	0,9311	1
Latinoamérica	6 (100)	1 (16,7)	5 (83,3)		1,11 (0,10-12,30)

Las variantes no prototipo fueron mayoritarias tanto en los pacientes infectados como no infectados por VIH-1, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en su distribución, ni en el análisis univariable de la infección por variante prototipo *vs.* no prototipo. Se observó el mismo patrón en cuanto a la variable origen

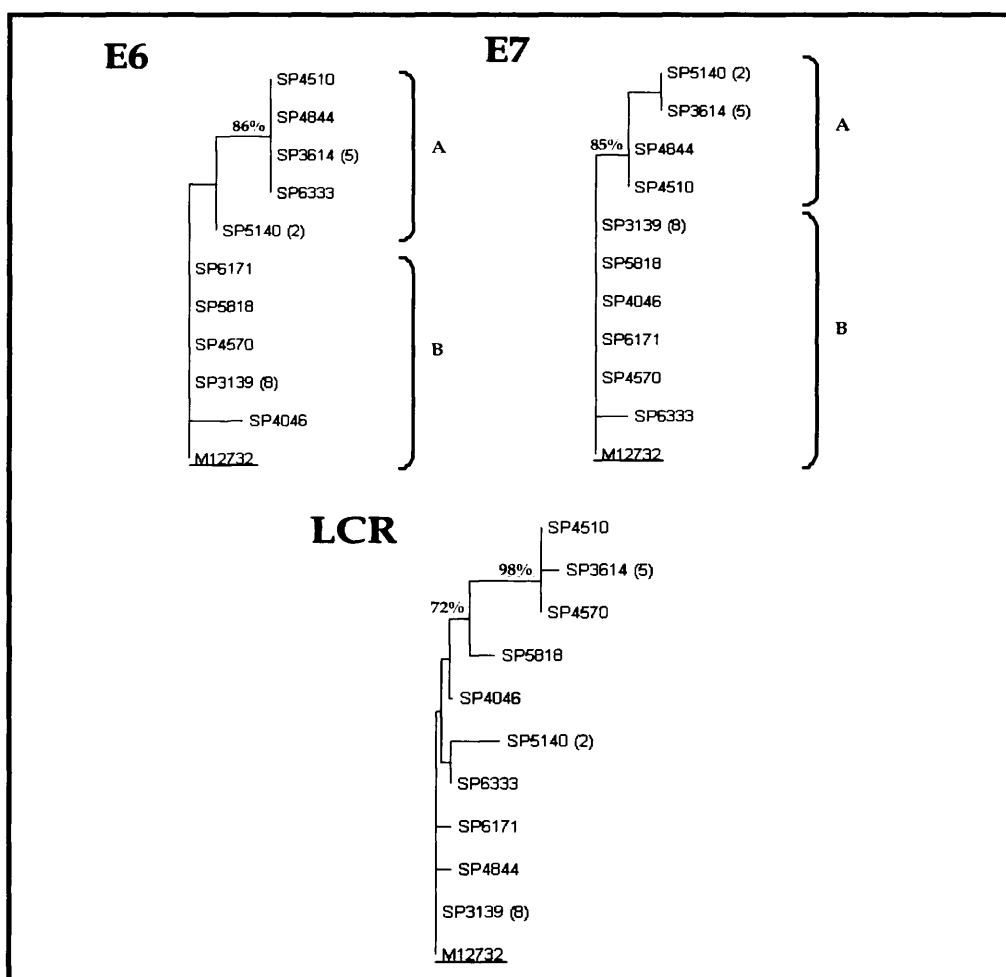
geográfico, siendo las variantes no prototipo mayoritarias entre los hombres españoles y latinoamericanos y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariable.

#### 4.3.4. Análisis de variantes de VPH33

El estudio de los polimorfismos se realizó en el total de 22 muestras caracterizadas como VPH33. Para la asignación de variantes se empleó como referencia el primer aislado secuenciado de VPH33 (Cole *et al.*, 1989).

##### 4.3.4.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH33

Los fenogramas obtenidos del análisis de cada una de las regiones estudiadas se indican en la **figura 4.5**



**Figura 4.5.** Análisis filogenético de las 22 muestras caracterizadas como VPH33 en las regiones codificantes de E6, E7 y la región reguladora (LCR). M12732, secuencia de referencia de VPH33 (Cole *et al.*, 1989). Entre paréntesis se indica el número de muestras que comparten la misma secuencia y que han sido simbolizadas por la secuencia representativa. Los números situados en las ramas indican los valores de *bootstrap* mayores del 70%.

El análisis filogenético se llevó a cabo en diez secuencias representativas de las 22 muestras de VPH33 analizadas. La secuencia denominada SP3139 representó ocho muestras que fueron idénticas en su secuencia con la secuencia prototipo, la secuencia SP3614 representó cinco muestras, SP5140 representó dos muestras y el resto representaban muestras individuales. El análisis filogenético en las regiones codificantes de E6 y E7 permitió la clasificación de las secuencias representativas en dos posibles ramas o *clusters*, con valores de *bootstrap* significativos. Este hecho no se observó al analizar la región reguladora LCR. La asignación de las diferentes secuencias a las dos ramas en las regiones codificantes fue idéntica, a excepción de la secuencia SP6333. La rama A estaba constituida por las secuencias representativas SP4510, SP4844, SP3614 y SP5140; y la rama B incluía el resto de secuencias. Los valores de *bootstrap* obtenidos fueron del 86% en la región codificante de E6 y del 85% en la región codificante de E7.

#### 4.3.4.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH33

La denominación de los diferentes patrones identificados en las 22 muestras infectadas por VPH33 ha sido la misma que la empleada para VPH31.

##### 4.3.4.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6

El estudio de los 449 pb del gen *e6* nos permitió definir tres patrones además del patrón prototipo, en los que se identificaron un total de cinco cambios en la secuencia de nucleótidos en posiciones tanto descritas como no descritas (**Tabla 4.31**).

**Tabla 4.31.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E6 y frecuencia de variantes en las 22 muestras de VPH33 analizadas.

Patrón	Secuencia VPH33 E6					Total	
	2	3	3	3	4		
	1	3	4	6	8		
	3	8*	6*	4	0	N	%
Prototipo	A	G	A	A	A	11	50
33-E6-1	C	-	-	C	T	8	36,4
33-E6-2	C	-	-	-	-	2	9,1
<b>33-E6-3</b>	-	A	T	-	-	1	4,5

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez; en negrita se indican los patrones descritos como nuevos.

La secuencia prototipo fue la más frecuente (50%). A continuación se observó el patrón denominado 33-E6-1 en ocho muestras (36,4%) que incluyó tres cambios en las posiciones nucleotídicas: 213(A→C), 364(A→C), 480(A→T). El patrón 33-LCR-2 se identificó en dos muestras (9,1%) y presentó un cambio único en la posición nucleotídica 213(A→C).

Se definió como nuevo el patrón denominado 33-LCR-3, que se observó en una única secuencia (4,5%), y presentó dos posiciones nucleotídicas con cambios no descritos previamente; la posición 338(G→A) y la posición 346(A→T).

En la **tabla 4.32** se indican las posiciones nucleotídicas y proteicas con mutación descritas en la región codificante de E6, así como la frecuencia de las mismas. Todas las mutaciones observadas dieron lugar a cambio de aminoácido, con la excepción de la transversión A→T de la posición nucleotídica 480. La transversión A→C en el nucleótido en posición 213 que dio lugar a un cambio de un aminoácido con carga positiva (Lisina) a neutro (Asparagina), fue la mutación que se observó con más frecuencia (45,5%) en la muestras estudiadas; le siguió la transversión A→C en la posición 364 (36,4%), que indujo un cambio de Asparagina a Tirosina en el codón 86 y que se detectó en el 36,4% de la muestras. Las mutaciones nuevas de las posiciones nucleotídicas 338 y 346 dieron lugar a cambios en los aminoácidos en posiciones 77 y 80.

**Tabla 4.32.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH33 en la región codificante de E6 de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
		Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	%
E6	213	A	C	K	N	35	Tv, Ms	10	45,5
	338	G	A	R	K	77	Ts, Ms	1	4,5
	346	A	T	N	Y	80	Tv, Ms	1	4,5
	364	A	C	N	H	86	Tv, Ms	8	36,4
	480	A	T	R	-	124	Tv, S	8	36,4

Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa.

#### 4.3.4.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7

El estudio de los polimorfismos de la secuencia de la región codificante de E7, nos permitió identificar tres patrones y la secuencia prototipo (**Tabla 4.33**).

El patrón mayoritario correspondió a la secuencia prototipo, que se detectó en doce muestras (54,4%). El patrón denominado 33-E7-1 fue identificado en siete muestras (31,8%) y se definió por presentar dos cambios en las posiciones nucleotídicas 737(A→G) y 862(A→T). El patrón 33-E7-2 fue identificado en dos secuencias (9,1%) que presentaron un cambio único en la posición 862(A→T). El patrón 33-E7-3, con una única variación en la posición 608(T→G), fue descrito en una secuencia (4,5%).

**Tabla 4.33.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E7 y frecuencia de variantes en las 22 muestras de VPH33 analizadas.

Patrón	Secuencia VPH33 E7			Total	
	6	7	8		
	0	3	6		
	8	7	2	N	%
Prototipo	T	A	A	12	54,4
33-E7-1	-	G	T	7	31,8
33-E7-2	-	-	T	2	9,1
33-E7-3	G	-	-	1	4,5

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo.

Las implicaciones a nivel de cambios en la secuencia de proteínas de las mutaciones detectadas en la región codificante de E7, así como la frecuencia de las mismas se muestran en la **tabla 4.34**. Sólo la transversión A→T en el nucleótido 862, identificada en nueve muestras (40,9%), dio lugar a un cambio de aminoácido polar a apolar (Glutamina a Leucina) en el codón 97.

**Tabla 4.34.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH33 en la región codificante de E7 de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
		Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	%
E7	608	T	G	V	-	12	Tv, S	1	4,5
	737	A	G	V	-	55	Ts, S	7	31,8
	862	A	T	Q	L	97	Tv, Ms	9	40,9

Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa.

#### 4.3.4.2.3. Polimorfismos en la región reguladora

El análisis de polimorfismos en la región reguladora nos permitió identificar siete patrones diferentes, en base a cambios en 13 posiciones de nucleótidos y una delección de una secuencia en tándem de 79 pares de bases a partir del nucleótido 7596 (**Tabla 4.35**). Los patrones descritos presentaron cambios en posiciones nucleotídicas que ya habían sido definidas previamente en la bibliografía, con la excepción de dos posiciones que definieron un patrón nuevo: 33-LCR-3.

El patrón prototipo fue el más frecuente al localizarse en ocho aislados (36,4%). Le siguió el patrón 33-LCR-1, que se observó en siete secuencias (31,8%) y que presentó cambios en siete posiciones: 7704(T→A), 7422(G→T), 7443(C→T), 7454(G→A), 7535(G→A), 7537(C→A), 7732(C→G) además de la delección. Este patrón fue el único en el que se identificó la delección descrita anteriormente. El patrón 33-LCR-2 presentó cuatro cambios en

las posiciones: 7422(G→T), 7424(A→G), 7436(A→G), 7481(T→G) y se localizó en dos muestras (9,1%). El patrón 33-LCR-3, se caracterizó como nuevo, ya que en los cuatro cambios que lo definían, las posiciones 7541(G→A) y 7772(C→T) eran observadas por primera vez. El resto de los patrones descritos en la región (33-LCR-4, 33-LCR-5, 33-LCR-6 y 33-LCR-7), se caracterizaron por presentar cambios en una única posición nucleotídica y fueron identificados en secuencias individuales (4,5%).

**Tabla 4.35.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región reguladora estudiada y frecuencia de variantes en las 22 muestras de VPH33 analizadas.

Patrón	Secuencia VPH 33 LCR														Total	
	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	D		
	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	7	7	7		
	0	2	2	3	4	5	8	3	3	4	8	3	7	9		
	4	2	4	6	3	4	1	5	7	1*	4	2	2*	pb	N	%
Prototipo	T	G	A	A	C	G	T	G	C	G	G	C	C		8	36,4
33-LCR-1	A	T	-	-	T	A	-	A	A	-	-	G	-	+	7	31,8
33-LCR-2	-	T	G	G	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	2	9,1
<b>33-LCR-3</b>	-	T	-	-	-	-	-	A	-	A	-	-	T	-	1	4,5
33-LCR-4	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	1	4,5
33-LCR-5	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4,5
33-LCR-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	1	4,5
33-LCR-7	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4,5

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (+) presencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez y en negrita los patrones descritos por primera vez; D79pb, delección de 79 pares de bases.

Las posiciones nucleotídicas con cambio y la frecuencia de los mismos en la región reguladora se indican en la **tabla 4.36**. El cambio que se detectó con más frecuencia entre las secuencias (50%) fue la transversión G→T del nucleótido en posición 7422, y le siguió la transición G→A del nucleótido en posición 7535 que se detectó en nueve muestras (40,9%). La mutación en el nucleótido 7422 afectó al sitio de unión del factor de transcripción SRY, y la mutación en la posición nucleotídica 7535 no afectó al sitio de unión de ningún factor de transcripción. Se describieron siete mutaciones más en la secuencia de nucleótidos que implicaban alteraciones en los sitios de unión de factores de transcripción. Los cambios en las posiciones nucleotídicas 7443 y 7732 se identificaron en siete muestras (31,8%), y afectaron a los sitios de unión de la proteína SRY y el factor estimulante aguas arriba (USF, *Upstream Transcription Factor*). De la misma manera, los cambios en las posiciones 7424 y 7436, presentes en dos muestras (9,1%), afectaron a la unión de los factores de transcripción SRY y C/EBP, respectivamente. El cambio descrito en la posición nucleotídica 7481(T→G),



que se identificó en dos muestras afectó al sitio de unión de los factores de transcripción C/EBP y YY1. La delección descrita en esta región, supuso la pérdida de un sitio de unión de los factores de transcripción c-Myb y SRY.

**Tabla 4.36.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH33 en la región reguladora estudiada de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, sitio de unión, y tipo de mutación.

Región	Posición nucleótido	Nucleótido		Sitio de unión	Tipo de mutación	Total	
		Prototipo	Variante			N	%
LCR	7404	T	A	-	Tv	7	31,8
	7422	G	T	SRY	Tv	11	50,0
	7424	A	G	SRY	Ts	2	9,1
	7436	A	G	C/EBP	Ts	2	9,1
	7443	C	T	SRY	Ts	7	31,8
	7454	G	A,C	-	Ts, Tv	7, 1	31,8; 4,5
	7481	T	G	C/EBP; YY-1	Tv	2	9,1
	7535	G	A	-	Ts	9	40,9
	7537	C	A	-	Tv	7	31,8
	7541	G	A	-	Ts	1	4,5
	7584	G	A	-	Ts	1	4,5
	7732	C	G	USF	Tv	7	31,8
	7772	C	T	-	Ts	1	4,5
	D7596	-	79pb	c-Myb, SRY		7	31,8

Ts, transición; Tv, Transversión; C/EBP, proteína de unión al potenciador CCAAT; YY-1, Factor ying-yang 1; SRY, Región Y Determinante del Sexo; USF, Factor estimulador corriente arriba.

#### 4.3.4.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6 y E7 y en la región reguladora

Como ya se ha indicado, en las secuencias analizadas no se localizaron inserciones, aunque si una delección en tándem de 79 pb en la región reguladora que en el estudio de la variabilidad de la región fue considerada como un cambio. Las variantes de la región codificante de E6 identificadas presentaron desde un nucleótido (0,2%) hasta un máximo de tres nucleótidos mutados (0,7%) con respecto a la secuencia de referencia; en la región codificante de E7 las variantes se definieron por presentar desde un cambio de nucleótido (0,3%) hasta un máximo de dos cambios (0,7%) en los 293 pb de la secuencia analizada; y el estudio de las 541 pb de la región reguladora nos permitió identificar variantes que incluyeron desde un cambio en la secuencia de nucleótidos (0,2%) hasta un máximo de ocho cambios de nucleótidos en la secuencia (1,5%).

El número medio de sitios con variación en la región codificante de E6 fue de dos (media de  $1,5 \pm 1,3$ ; rango 0-3 mutaciones;  $p = 0,4$ ), un único sitio en el caso de la región

codificante de E7 (media de  $1 \pm 0,8$ ; rango 0-2 mutaciones;  $p = 1,0$ ) y en la región reguladora fue de tres sitios (media de  $2,5 \pm 2,6$ ; rango 0-8 mutaciones;  $p = 0,2$ ).

La variabilidad genética total fue significativamente mayor en la región reguladora que en los oncogenes virales, 92 sitios con variación en 541 pb estudiadas (17%), comparado con cinco sitios de variación en la región codificante de E6 ( $p < 0,05$ ), y tres cambios en la región codificante de E7 ( $p < 0,05$ ). Al comparar la variabilidad genética en las regiones codificantes de E6 y E7, los datos obtenidos nos permitieron describirla como equivalente ( $p = 0,8$ ).

En las región codificantes de E6 y E7 las posiciones nucleotídicas 338, 348 y 608 fueron únicas entre las variantes al no ser compartidas entre ellas. En la región reguladora se identificaron las posiciones nucleotídicas 7454, 7541, 7584 y 7772.

#### **4.3.4.4. Distribución de variantes de VPH33 entre los pacientes**

La distribución global de los patrones identificados en cada región nos permitió asignar ocho muestras como variante prototipo (36,4%) y 14 muestras como variantes no prototipo (63,6%), como se indica en la **tabla 4.37**.

La variante representada con la secuencia SP3139 fue la más frecuente (36,4%) e incluyó la secuencia prototipo en las tres regiones analizadas. La variante representada con la secuencia SP3614 se identificó en cinco muestras (22,7%) y la variante representada con la secuencia SP5140 en dos muestras (9,1%). El resto de variantes descritas (SP6171, SP5818, SP4570, SP4046, SP4510, SP4844 y SP6333) se identificaron en muestras individuales. Se identificaron dos variantes nuevas representadas por las secuencias: SP4046 y SP5818. La variante SP4046 de acuerdo a los cambios descritos en la región codificante de E6, y la variante SP5818 de acuerdo a dos cambios descritos por primera vez en la región reguladora y que no afectaron a los sitios de unión de ningún factor de transcripción.

En las variantes identificadas en este trabajo, la región codificante de E6 presentó cuatro posibles cambios de aminoácidos. En la nueva variante representada por la secuencia SP4046 los cambios de Arginina a Lisina y Asparagina a Tirosina, y en las variantes representadas por las secuencias SP3614, SP4510, SP4844 y SP6333 los cambios asociados con el patrón identificado que incluían: un cambio de Lisina a Asparagina y un cambio de Asparagina a Histidina.

En la región codificante de E7 sólo se describió un cambio de aminoácido (Q→L) que presentaron las variantes representadas por las secuencias SP5140, SP3614, SP4510 y SP4844.

**Tabla 4.37.** Asignación de variantes para cada rama filogenética en función de los patrones identificados en cada región genómica analizada y frecuencias para los 22 aislados de VPH33 estudiados.

[illegible]

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (+) presencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez. D79pb, delección de 79 pares de bases. En la parte inferior de las posiciones de nucleótidos con mutaciones se indican los cambios de aminoácidos (regiones E6 y E7) y los sitios de unión de factores de transcripción alterados (LCR). Se indican en negrita las variantes y patrones no descritos antes.

La región reguladora se caracterizó por la presencia o no de la delección de 79 pb. Las variantes representadas por las secuencias SP4570, SP3614 y SP4510 incluyeron el total de siete muestras en las que se identificó la delección (31,8%) que se asoció con un patrón característico que incluyó la alteración de hasta cuatro sitios de unión de factores de transcripción en la posiciones nucleotídicas: 7404, 7422, 7443, 7732. Entre las variantes que no presentaron la delección, la secuencia representativa SP5140 incluyó un patrón con tres sitios de unión a factores de transcripción alterados (SRY, C/EBP y YY-1); y en la variante representada por la secuencia SP6333 sólo se observó un posible cambio (SRY).

#### 4.3.4.5. Distribución de variantes de VPH33 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes

El análisis de la distribución de las variantes de VPH33 identificadas de acuerdo al estatus VIH-1 y al origen geográfico de los pacientes se muestra en la **tabla 4.38**. De las 22 muestras analizadas, nueve pertenecían a pacientes no infectados por VIH-1 y 13 pacientes infectados por VIH-1. Con respecto al origen geográfico de los pacientes, 16 muestras eran de hombres españoles, cinco de hombres procedentes de un país latinoamericano, y una pertenecía a un paciente portugués, aunque esta última fue excluida del análisis.

De acuerdo con el estatus VIH-1 de los pacientes, la distribución de variantes prototipo entre los pacientes no infectados e infectados por VIH-1 fue similar; siendo las variantes no prototipo las más prevalentes. Una distribución similar, se observó de acuerdo al origen geográfico de los pacientes, y tanto en los pacientes de origen español como latinoamericano fueron las variantes no prototipo las más prevalentes. Tal y como se observa en la tabla, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variantes, ni en el análisis univariable de la infección de la variante prototipo *vs.* no prototipo de acuerdo al estatus VIH-1 de los pacientes. El análisis de la distribución de acuerdo al origen geográfico, todas las variantes prototipo se identificaron en pacientes de origen español.

**Tabla 4.38.** Prevalencia de las variantes asignadas como prototipo y no prototipo de VPH33 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.

	Total	Prevalencia		p-valor	OR (IC95%)
	N (%)	Variante Prototipo N (%)	Variante no prototipo N (%)		
<b>Estatus VIH-1</b>	<b>22</b>				
Negativo	9 (100)	4 (44,4)	5 (55,5)	0,5132	1 11,8 (0,30-10,51)
Positivo	13 (100)	4 (30,8)	9 (69,2)		
<b>Origen geográfico</b>	<b>21</b>				
España	16 (100)	7 (43,7)	9 (56,3)	-	-
Latinoamérica	5 (100)	-	5 (100)		

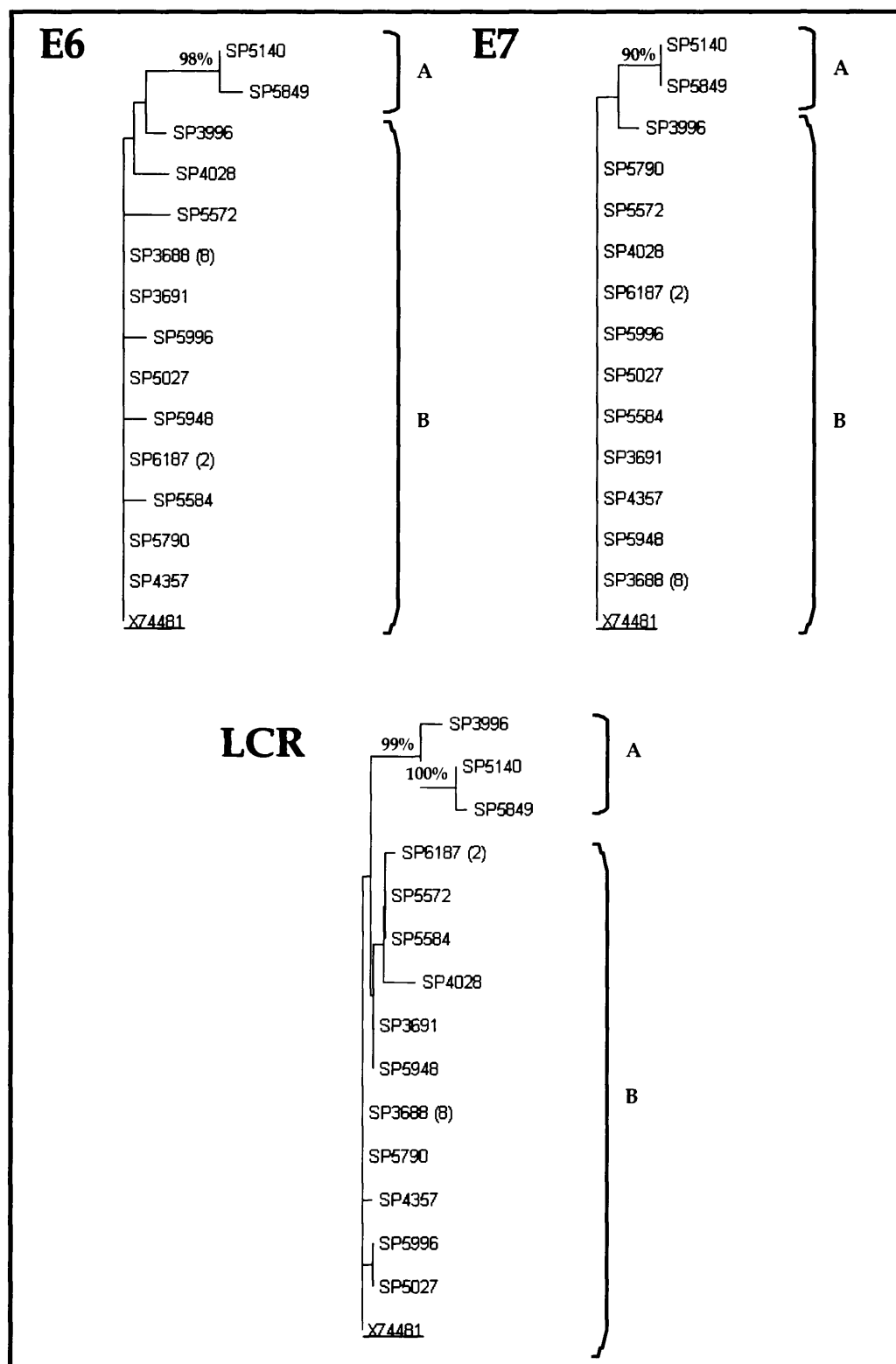
#### 4.3.5. Análisis de variantes de VPH52

Del total de 25 muestras de pacientes HSH infectados por VPH52, el análisis de polimorfismos se llevó a cabo en 22 muestras. En una muestra no se disponía de suficiente ADN y en dos muestras la calidad de las secuencias de las tres regiones, en repetidas ocasiones, no fue óptima. El análisis de las variantes se realizó empleando la secuencia de referencia (X74481) aislada de una paciente de Estados Unidos (Deliuss *et al.*, 1994).

##### 4.3.5.1. Análisis filogenético de muestras infectadas por VPH52

El análisis filogenético de las muestras se realizó en catorce secuencias representativas y los fenogramas obtenidos en cada una de las regiones estudiadas se indican en la **figura 4.6** La secuencia SP3688 representó ocho muestras que fueron idénticas a la secuencia prototipo, la secuencia SP6187 representó dos muestras, y el resto de las secuencias representativas correspondían a una única muestra clínica: SP5790, SP5849, SP5140, SP4028, SP5572, SP5584, SP5027, SP5996, SP3996, SP4357, SP3691 y SP5849.

La filogenia de las regiones codificantes de E6 y E7 y la región reguladora nos permitió distinguir dos posibles ramas o *clusters* con valores de *bootstrap* significativos (A y B). La asignación de todas las secuencias representativas de las muestras clínicas analizadas en las dos ramas descritas, fue igual en las tres regiones del genoma, con la excepción de la secuencia representativa SP3996. La rama A incluía las secuencias representativas SP5140 y SP5849, con valores de *bootstrap* del 98% y 90% en las regiones codificantes E6 y E7, respectivamente. En la región reguladora esta rama agrupó además de las dos secuencias representativas descritas, la secuencia SP3996 con un valor de *bootstrap* del 99%. La rama B incluyó en las regiones codificantes E6, E7 y la región reguladora el resto de secuencias del estudio.



**Figura 4.6.** Análisis filogenético de las 22 muestras caracterizadas como VPH52 en las regiones codificantes de E6, E7 y la región reguladora (LCR). X74481, secuencia de referencia de VPH52 (Deliuss *et al.*, 1993). Entre paréntesis se indica el número de muestras que comparten la misma secuencia y que han sido simbolizadas por la secuencia representativa. Los números situados en las ramas indican los valores de *bootstrap* mayores del 70%.

#### 4.3.5.2. Polimorfismos en las regiones codificantes de las proteínas E6, E7 y en la región reguladora de VPH52

La designación de los patrones identificados en cada región se llevo a cabo empleando la misma nomenclatura que en los genotipos de VPH31 y 33, descritos anteriormente.

##### 4.3.5.2.1. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E6

En el estudio de la región codificante de E6 identificamos ocho patrones de secuencia además de la secuencia de referencia o prototipo (Tabla 4.39).

La secuencia prototipo fue la más frecuente al identificarse en 13 muestras (59,1%). En dos muestras (9,1%) se describió el patrón denominado 52-E6-1, con un único cambio en la posición nucleotídica 123(C→A). El resto de los patrones descritos, sólo se identificaron en un aislado (4,5%) y se definieron con cambios en posiciones nucleotídicas que ya habían sido descritas. La excepción fue el patrón que se denominó 52-E6-8 y que incluyó cinco cambios en las posiciones nucleotídicas: 200(C→T), 237(C→T), 332(G→A), 350(G→T) y 425(G→T). La mutación G→A en la posición nucleotídica 332 es la primera vez que se describe.

**Tabla 4.39.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E6 y frecuencia de variantes en las 22 muestras de VPH52 analizadas.

Patrón	Secuencia VPH52 E6												Total	
	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	4		
	2	4	7	0	3	5	3	5	7	7	0	2		
	3	3	1	0	7	1	2*	0	5	9	4	5	N	%
Prototipo	C	A	C	C	C	A	G	G	G	A	T	G	13	59,1
52-E6-1	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	9,1
52-E6-2	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4,5
52-E6-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	1	4,5
52-E6-4	-	C	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	1	4,5
52-E6-5	-	-	-	-	-	G	-	-	-	G	-	-	1	4,5
52-E6-6	-	-	-	-	-	-	-	T	-	G	-	-	1	4,5
52-E6-7	-	-	-	T	T	-	-	T	-	-	-	T	1	4,5
52-E6-8	-	-	-	T	T	-	A	T	-	-	-	T	1	4,5

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez y en negrita los patrones descritos por primera vez.

En la **tabla 4.40** se muestran las mutaciones que se observaron en la región codificante de E6, los cambios de aminoácidos que producen y la frecuencia de los mismos. El cambio más frecuente correspondió a la transversión G→T en el nucleótido 350, observada en tres muestras (13,6%), que no induce cambio en el aminoácido en el codón en posición 83. Del resto de cambios observados, siete dieron lugar a mutaciones silenciosas,

incluida el cambio descrito por primera vez en la posición nucleotídica 332, y cuatro mutaciones dieron lugar a cambios de aminoácidos. La posición nucleotídica 143, indujo un cambio de Acido Glutámico a Acido Aspártico en el codón en posición 14. La mutación en el nucleótido 171 dio lugar a un cambio de aminoácidos con polaridad diferente en el codón en posición 24 (Histidina a Acido Aspártico). La transición G→T en el nucleótido en posición 375 indujo un cambio de Valina a Leucina en el codón en posición 92, y la transición A→G en la posición 379, codificó el cambio entre dos aminoácidos básicos (Lisina y Arginina) en el codón 93 (K93R). Todas las mutaciones con sentido se identificaron en muestras individuales (4,5%), excepto la mutación que se observó en dos muestras (9,1%).

**Tabla 4.40.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH52 en la región codificante de E6 de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
		Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	(%)
E6	123	C	A	R	-	8	Tv, S	2	9,1
	143	A	C	E	D	14	Tv, Ms	1	4,5
	171	C	G	H	D	24	Tv, Ms	1	4,5
	200	C	T	C	-	33	Ts, S	2	9,1
	237	C	T	L	-	46	Ts, S	2	9,1
	251	A	G	L	-	50	Ts, S	1	4,5
	332	G	A	R	-	77	Ts, S	1	4,5
	350	G	T	L	-	83	Tv, S	3	13,6
	375	G	T	V	L	92	Tv; Ms	1	4,5
	379	A	G	K	R	93	Ts, Ms	2	9,1
	404	T	C	I	-	101	Ts, S	1	4,5
	425	G	T	T	-	108	Tv, S	2	9,1

Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa.

#### 4.3.5.2.2. Polimorfismos en la región codificante de la proteína E7

El estudio de los polimorfismos en los 299 pb que codifican la proteína E7, nos permitió identificar tres patrones diferentes y cuatro posiciones con cambios en la secuencia; todos descritos previamente (Tabla 4.41). La secuencia prototipo fue la más frecuente al detectarse en 19 muestras (86,4%), seguida del patrón 52-E7-1 (9,1%) que se definió por presentar tres cambios en las posiciones 573(T→C), 766(C→A) y 801(A→G). El patrón 52-E7-2 se observó en una muestra (4,5%) y se caracterizó por presentar dos variaciones en las posiciones 751(C→T) y 801(A→G).



**Tabla 4.41** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región codificante de E7 y frecuencia de variantes en las 83 muestras de VPH52 analizadas.

Patrón	Secuencia VPH52 E7				Total	
	5	7	7	8		
	7	5	6	0		
	3	1	6	1	N	%
Prototipo	T	C	C	A	19	86,4
52-E7-1	C	-	A	G	2	9,1
52-E7-2	-	T	-	G	1	4,5

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo.

Las posiciones con mutaciones descritas en la región codificante de E7, así como la frecuencia de las mismas se indican en la **tabla 4.42**. El cambio mas frecuente fue la transición A→G en la posición 801 que se detectó en tres muestras (13,6%) y que dio lugar a una mutación silenciosa en el codón en posición 83. Las sustituciones en los nucleótidos 573(T→C) y 766(C→T), codificaron para una mutación silenciosa la primera y un cambio de aminoácido básico (Histidina) a neutro (Asparagina) la segunda, y se observaron en dos secuencias (9,1%). La mutación silenciosa en la posición nucleotídica 751, se identificó en una muestra (4,5%).

**Tabla 4.42.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH52 en a región codificante de E7 de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, aminoácido, codón y tipo de mutación.

Región	Posición nucleótido	Nucleótido		Aminoácido		Codón	Tipo de mutación	Total	
		Prototipo	Variante	Original	Alterado			N	(%)
E7	573	T	C	T	-	7	Ts, S	2	9,1
	751	C	T	L	-	67	Ts, S	1	4,5
	766	C	A	H	N	72	Tv, Ms	2	9,1
	801	A	G	Q	-	83	Ts, S	3	13,6

Ts, transición; Tv, transversión; Ms, cambio con sentido; S, mutación silenciosa.

#### 4.3.5.2.3. Polimorfismos en la región reguladora

El análisis de la región reguladora se llevó a cabo en 499 pb y nos permitió identificar 17 posiciones mutadas y dos delecciones ya descritas (Aho *et al.*, 2003). La primera delección incluyó tres pares de bases (CTT) a partir del nucleótido 7695 y la segunda 11 pares de bases (TCTTGCTGACT) a partir del nucleótido 7696. Los cambios descritos al comparar con la secuencia de referencia, nos permitieron identificar diez patrones (**Tabla 4.43**). Con la excepción de dos mutaciones en las posiciones nucleotídicas 7627 y 7719, que dieron lugar a dos patrones que se caracterizaron como nuevos (52-LCR-4, 52-LCR-6), el resto de las

posiciones con cambios ya estaban descritos. El patrón más frecuente fue la secuencia prototipo, que se identificó en nueve secuencias (40,9%). Los patrones 52-LCR-1 y 52-LCR-2 se observaron en dos secuencias (9,1%) y se caracterizaron por presentar un cambio único en la posiciones nucleotídicas 7580(A→C) y 7624(T →C), respectivamente. Los patrones 52-LCR-3 y 52-LCR-4 se identificaron en dos secuencias cada uno (9,1%) e incluyeron dos y tres cambios en la secuencia, respectivamente. El patrón 52-LCR-4 presento un cambio no descrito antes en la posición nucleotídica 7719(C→T), de forma que se caracterizó como variante nueva. El patrón 52-LCR-5, se identificó en una secuencia y sólo presentó un cambio en posición 7549 en la secuencia. El patrón 52-LCR-6, se identificó en una secuencia (4,5%) y se caracterizó como nuevo, porque presentó en las seis sustituciones que lo definieron un cambio no descrito antes en la posición nucleotídica 7627. Este patrón presentó además la delección de 3 pb descrita en esta región. El patrón 52-LCR-7 se localizó en una secuencia (4,5%) y presentó siete cambios en las posiciones nucleotídicas: 7622(G→A), 7624(T→G), 7657(A→C), 7659(T→C), 7712(G→C), 7861(G→A), 7865(A→G) y la delección de 3 pb. Los patrones 52-LCR-8 y 52-LCR-9 presentaron el mayor el mayor número de variaciones, nueve y diez respectivamente y fueron identificados en una muestra clínica (4,5%). En ambos patrones se observó la delección de 11 pb.

**Tabla 4.43.** Sustituciones nucleotídicas comparadas con la secuencia prototipo en la región reguladora estudiada y frecuencia de variantes en las 22 muestras de VPH52 analizadas.

Patrón	Secuencia VPH52 LCR																		Total		
	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7				
	4	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	8	8	D	D		
	2	4	7	7	8	0	2	2	2	5	5	1	1	4	4	6	6	3	11		
	4	9	1	9	0	2	2	4	7*	7	9	2	9*	3	4	1	5	pb	pb	N	%
Prototipo	C	A	C	A	A	T	G	T	A	A	T	G	C	C	T	G	A			9	40,9
52-LCR-1	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	9,1
52-LCR-2	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	9,1
52-LCR-3	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	2	9,1
52-LCR-4	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	T	T	-	-	-	-	-	2	9,1
52-LCR-5	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4,5
52-LCR-6	-	-	-	-	-	-	A	C	T	-	-	-	-	T	C	-	-	+	-	1	4,5
52-LCR-7	-	-	-	-	-	-	A	G	-	C	C	C	-	-	-	A	G	+	-	1	4,5
52-LCR-8	T	-	G	C	-	-	A	G	-	-	-	C	-	-	-	A	G	-	+	1	4,5
52-LCR-9	T	-	G	C	-	A	A	G	-	-	-	C	-	-	-	A	G	-	+	1	4,5

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (+) presencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez; D3pb, delección de tres pares de bases; D11pb, delección de 11 pares de bases.

Los cambios de nucleótidos localizados en la región reguladora y la frecuencia de los mismos, así como los posibles sitios de unión de factores de transcripción alterados se

muestran en la **tabla 4.44**. El cambio que se detectó con más frecuencia entre las muestras fue la transición T→C en el nucleótido 7624 al identificarse en siete muestras (50%), seguido de la transición C→T en el nucleótido 7743 que se observó en cinco muestras (35,7%). Ambos cambios, afectaron al sitio de unión del factor de transcripción C/EBP. La transición G→A en la posición nucleotídica 7622, se describió en cuatro muestras (28,6%) y la trasversión A→T en la posición nucleotídica 7627 descrita por primera vez (7,1%), de la misma manera que en los casos anteriores, afectaron al sitio de unión del factor C/EBP. Los cambios observados en las posiciones nucleotídicas 7571(C→G), 7861(G→A) y 7865(A→G) dieron lugar a alteraciones en la secuencia que afectaron a los sitios de unión de la proteína viral E2. Las deleciones de 3 y 11 pb descritas en la región y observadas en dos muestras (14,3%) cada una, afectaron al sitio de unión de la proteína activadora 1 (AP-1, *Activator Protein 1*). En las mutaciones descritas en la región reguladora, no se observaron más sitios de unión de factores de transcripción alterados, incluyendo la posición nucleotídica 7719 en la que se describió una mutación por primera vez.

**Tabla 4.44.** Cambios localizados y frecuencia de los mismos en las secuencias estudiadas de VPH52 en la región reguladora estudiada de acuerdo con la posición nucleotídica, nucleótido, sitio de unión, y tipo de mutación.

Región	Posición nucleótido	Nucleótido		Sitio de unión	Tipo de mutación	Total	
		Prototipo	Variante			N	(%)
LCR	7424	C	T	-	Ts	2	14,3
	7549	A	C	-	Tv	1	7,1
	7571	C	G	E2	Tv	2	14,3
	7579	A	C	-	Tv	2	14,3
	7580	A	C	-	Tv	2	14,3
	7602	T	A	-	Tv	1	7,1
	7622	G	A	C/EBP	Ts	4	28,6
	7624	T	G,C	C/EBP	Tv,Ts	3;7	21,4; 50
	7627	A	T	C/EBP	Tv	1	7,1
	7657	A	C	-	Tv	1	7,1
	7659	T	C	-	Ts	1	7,1
	7712	G	C	-	Tv	3	21,4
	7719	C	T	-	Ts	2	14,3
	7743	C	T	C/EBP	Ts	5	35,7
	7744	T	C	-	Ts	1	7,1
	7861	G	A	E2	Ts	3	21,4
	7865	A	G	E2	Ts	3	21,4
	7695	-	D3pb	AP-1		2	14,3
	7696	-	D11pb	AP-1		2	14,3

Ts, transición; Tv, transversión; C/EBP, proteína de unión al potenciador CCAAT; E2, proteína viral E2; AP-1, proteína activadora 1; D3pb, deleción de tres pares de bases; D11pb, deleción de 11 pares de bases.

#### 4.3.5.3. Comparación de los polimorfismos en las regiones codificantes de E6 y E7 y en la región reguladora

En el análisis de las secuencias se identificaron dos deleciones de tres y once pb en los 499 pb estudiados de región reguladora, que como en el genotipo VPH33, fueron consideradas un cambio para el análisis de variabilidad.

Así las variantes de la región codificante de E6 presentaron en la secuencia desde un cambio (0,2%) hasta un máximo de cinco cambios de nucleótidos (1,1%) con respecto a la secuencia de referencia en los 443 pb estudiados; en la región codificante de E7 las variantes presentaron dos (0,7%) y tres cambios de nucleótido (1%) en 299 pb; y en la región reguladora en las variantes obtenidas se identificaron desde un cambio de nucleótido (0,2%) hasta diez cambios (2%) en los 499 pb estudiados. En la región codificante de E6 el número medio de posiciones con cambio fue de dos (media de  $2 \pm 1,6$ ; rango 0-5 mutaciones), en la región codificante de E7 fue de dos (media de  $1,6 \pm 1,5$ ; rango 0-3 mutaciones) y en la región reguladora el número medio fue cuatro (media de  $4,1 \pm 3,8$ ; rango 0-10 mutaciones).

La proporción total de nucleótidos polimórficos fue mayor en la región reguladora que en las regiones codificantes de E6 y E7, 20 sitios (delección de tres pares de bases) y 28 sitios (delección de 11 pares de bases) en 499 pares de bases (4-5,6%), comparado con 12 sitios de variación en la región codificante de E6 ( $p = 0,35$ ;  $p = 0,04$ ) y cuatro cambios en la región codificante de E7 ( $p = 0,03$ ;  $p < 0,05$ ). En el caso de la región codificante de E7, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar aquellas variantes que presentaron la delección de 3 pb en la región reguladora pero sí cuando se comparó con las variantes que presentaron la delección de 11 pb. En las regiones codificantes de E6 y E7 la variabilidad genética fue equivalente ( $p = 0,31$ ).

#### 4.3.5.4. Distribución de variantes de VPH52 entre los pacientes

En la **tabla 4.45** se indican las variantes identificadas en las 22 muestras de pacientes infectados por VPH52; ocho muestras fueron clasificadas como prototipo (36,4%) y 14 muestras como variantes no prototipo (63,6%). La variante representada por la secuencia SP3688 fue la más frecuente (36,4%) y presentó la secuencia prototipo en las tres regiones analizadas.

**Tabla 4.45.** Asignación de variantes para cada rama filogenética en función de los patrones identificados en cada región genómica analizada y frecuencia de las mismas para los 22 aislados de VPH52 estudiados.

Secuencia representativa	Patron E6	Patron E7	Patron LCR	* *											Total (N = 22)
				1	2	3	3	3	3	4	4	5	7	7	N
SP3688	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
SP6187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
SP5027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP4357	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP3691	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP5790	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP5996	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP5948	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP5584	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP5572	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP4028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP3996	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP5140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SP5849	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	E H	V K	H	E2	C/EBP	C/EBP	C/EBP	C/EBP	C/EBP	E2	C/EBP	E2	E2	AP-1	4,5
	↓ ↓	↓ ↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	AP-1	4,5
	D D	L R	N												4,5

Los números verticales describen la posición nucleotídica; (-) ausencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (+) presencia de variación con respecto a la secuencia prototipo; (\*) posición con cambios descritos por primera vez; D3pb, delección de tres pares de bases; D11pb, delección de 11 pares de bases. En la parte inferior de las posiciones de nucleótidos con mutaciones se indican los cambios de aminoácidos (regiones E6 y E7) y los sitios de unión de factores de transcripción alterados (LCR). Se indican en negrita las variantes y patrones no descritos antes.

La variante nueva SP6187, se identificó en dos muestras (9,1%) y se caracterizó únicamente por tres cambios en la región reguladora que afectaron a dos sitios de unión del factor de transcripción C/EBP. El resto de variantes que se describieron en el presente trabajo se identificaron en una muestra única (4,5%). Las variantes SP5027, SP4357 y SP3691 son muy similares, presentando la secuencia prototipo en las regiones codificantes, y un único cambio de nucleótido en la región reguladora. La variante nueva representada por la secuencia SP5849 y la variante SP5140 se presentaron con patrones muy similares en las tres regiones estudiadas, difiriendo por presentar la variante SP5849 un cambio nuevo en la región codificante de E6, que no induce ningún cambio de aminoácido y la posición nucleotídica 7622 en la región reguladora. Esta variante presentó el mayor número de variaciones de secuencia en las tres regiones, cuando se comparó con la secuencia de referencia. Las variantes en la región codificante de E6 presentaron ninguno (SP5790, SP5996, SP5584, SP5140, SP5849), uno (SP5948, SP4028, SP3996) o dos (SP5572) cambios de aminoácidos. En la región codificante de E7 las variantes representadas por las secuencias SP5140 y SP5849 son las únicas en las que se presentaron variaciones, aunque sólo la posición nucleotídica 766 (incluida en las variantes SP5140 y SP5849), induce un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína. En la región reguladora las variantes SP5140 y SP5849 presentaron el mayor número de sitios de unión para factores de transcripción alterados e incluyeron además la delección de 11 pb descrita en la región. La variante SP4028 se caracterizó como nueva debido al cambio en la posición nucleotídica 7627 que afectó al sitio de unión del factor C/EBP; y junto con la variante SP3996 presentaron en la región la delección de 3 pb.

#### 4.3.6.5. Distribución de variantes de VPH52 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes

La distribución de las variantes asignadas como prototipo o no prototipo, se describió de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes (**Tabla 4.46**). De las 22 muestras analizadas, 15 pertenecían a pacientes infectados por VIH-1 y siete a pacientes no infectados por VIH-1. Con respecto al origen geográfico de los pacientes, trece muestras eran de hombres españoles, ocho muestras de hombres de origen latinoamericano y se excluyó del análisis la muestra de un paciente de origen europeo distinto al español.

De acuerdo con el estatus VIH-1 de los pacientes, en ambos grupos las variantes no prototipo fueron mayoritarias. De acuerdo al origen geográfico de los pacientes, en los pacientes de origen español las variantes no prototipo fueron las más prevalentes, y en los hombres de origen latinoamericano las variantes prototipo y no prototipo se distribuyeron

de forma homogénea. En ninguno de los grupos de estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variantes, ni en el análisis univariable de la infección por variante prototipo *vs.* no prototipo.

**Tabla 4.46.** Prevalencia y análisis univariable de las variantes asignadas como prototipo y no prototipo de VPH52 de acuerdo al estatus VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes.

	Total	Prevalencia		p-valor	OR (IC95%)
	N (%)	Variantes Prototipo N (%)	Variantes no prototipo N (%)		
<b>Estatus VIH-1</b>	<b>22</b>				
Negativo	7	2 (28,6)	5 (71,4)		1
Positivo	15	6 (40)	9 (60)	0,5999	0,6 (0,08-4,16)
<b>Origen geográfico</b>	<b>21</b>				
España	13	3 (23)	10 (76,9)		1
Latinoamérica	8	4 (50)	4 (50)	0,2062	0,3 (0,04-1,99)







## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Prevalencia global y tipo específica de VPH de alto riesgo

En el cáncer cervical, los tipos 16 y 18 del VPH se detectan en el 70% de los cánceres escamosos y en el 86% de los casos de adenocarcinomas (Muñoz *et al.*, 2006; Castellsagué *et al.*, 2006). Los valores de prevalencia de infección de otros tipos de alto riesgo, no son tan homogéneos y difieren entre los diferentes países e incluso entre diferentes regiones geográficas del mismo país. En este sentido, los datos publicados por el IARC a nivel mundial, sitúan al VPH31 y VPH33 en la segunda y tercera posición respectivamente, de los tipos que se detectan con más frecuencia en las lesiones de alto grado y VPH52 en la sexta posición (Smith *et al.* 2007; Clifford *et al.*, 2003;). A diferencia de lo que ocurre con la infección por VPH en las mujeres, los datos de prevalencia de la infección por VPH en los hombres son más escasos en la literatura (Dunne *et al.*, 2006; Giuliano *et al.*, 2007; Nielson *et al.*, 2007); y en el caso más concreto de la infección anal la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en HSH infectados por VIH-1. Esto se debe fundamentalmente, a que se ha observado en este grupo de pacientes un incremento de la incidencia de cáncer anal en los últimos años. (Frisch *et al.*, 2000, 2001; Mbulaiteye *et al.*, 2003; Dal Maso *et al.*, 2003; Parkin *et al.*, 2006b; Hessol *et al.*, 2007). Hasta la fecha no han sido publicados estudios que indiquen la distribución a nivel mundial de los tipos VPH más frecuentes en lesiones preneoplásicas o en cáncer anal. En el año 2009, Hoots *et al.* realizaron una revisión sistemática de la bibliografía publicada sobre la distribución de tipos de VPH en cáncer anal y lesiones intraepiteliales precursoras. Los datos obtenidos de esta revisión, describieron una prevalencia global de VPH del 71, 91 y 88%, en cáncer anal, HSIL y LSIL, respectivamente. La prevalencia de VPH16 y 18 fue del 72% en cáncer anal, del 69% en HSIL y del 27% en LSIL, observándose que la prevalencia de VPH16 y/o 18 en cáncer anal invasivo es similar a la que se describe para cáncer cervical invasivo. Los datos de prevalencia tipo específica obtenidos analizando muestras de biopsias, establecieron los tipos VPH33, VPH31 en tercera y cuarta posición en el cáncer anal, después de VPH16 y VPH18.

En el caso concreto de la infección anal por VPH en HSH infectados por VIH-1, se observan unos valores de prevalencia de infección especialmente elevados, hecho que puede estar relacionado con la mayor persistencia de la infección en los pacientes inmunocomprometidos (Palefsky *et al.*, 2009). En la actualidad son poco conocidos los determinantes de la persistencia viral, pero la respuesta inmunitaria parece esencial, de ahí que el aclaramiento de la infección se vea comprometido en las personas VIH-positivas y

que, en ellas, los valores de CD4 y carga viral sean un importante determinante de la persistencia viral, aumentando la probabilidad de progresión a neoplasias intraepiteliales anales (Ahdieh *et al.* 2001; Palefsky *et al.* 2001, 2007; Fife *et al.* 2009). La mayor parte de los estudios de prevalencia de infección anal por VPH en HSH, publicados hasta el momento, incluyen series muy reducidas de pacientes, siendo además muy limitados en Europa y más en concreto en España.

En el presente trabajo la población de estudio fueron 401 HSH que acudieron a una clínica de ETS en Madrid. De ellos, el 58,1% de los hombres no estaban infectados por VIH-1, el 35,7% estaban infectados por VIH-1 y en el resto se desconocía su estatus frente a la infección por VIH-1. La prevalencia global de infección por VPH-AR, mediante la tecnología de captura de híbridos, fue del 54,9%, y cuando los resultados se analizaron estratificando de acuerdo a la presencia o no de anticuerpos frente a VIH-1, se observó que la prevalencia de infección en aquellos pacientes infectados por VIH-1 era significativamente superior (74,8 *vs.* 43,3%;  $p < 0,001$ ). El análisis univariado mostró que estar infectado con VIH-1 estaba asociado con presentar una prevalencia de VPH-AR cuatro veces mayor, resultados que confirman los trabajos realizados por otros grupos, en los que los factores de riesgo para la presencia de la infección anal por VPH incluyen la infección por VIH-1, bajos niveles de CD4, la presencia de verrugas genitales y una historia de relaciones sexuales anales receptivas (Critchlow *et al.*, 1998). En el análisis de la variable origen geográfico, en el grupo de pacientes infectados por VIH-1, se observó que proceder de un país latinoamericano estaba asociado con una probabilidad entre cuatro y cinco veces mayor (OR 4,6; IC95%:1,3-16,4) de presentar una infección anal por VPH-AR. Los datos de prevalencia de infección por VPH-AR obtenidos, son muy similares a los publicados en otros trabajos, describiéndose una mayor prevalencia de infección por VPH en HSH infectados por VIH-1 frente a los no infectados. Los primeros trabajos realizados en estudios de cohortes de HSH en Estados Unidos, mostraron una prevalencia de la infección anal por VPH del 60% entre los hombres no infectados por VIH-1 y del 93% en los hombres infectados por VIH-1 en la ciudad de San Francisco (Palefsky *et al.*, 1998a); y valores del 65,9% para los hombres no infectados por VIH-1 y del 91,6% entre los pacientes infectados por VIH-1 ( $p < 0,0001$ ), en la ciudad de Seattle (Critchlow *et al.*, 1998). Estos primeros datos de infección anal por VPH en cohortes de conveniencia en Estados Unidos, se han confirmado con los datos más recientes publicados en el primer estudio poblacional llevado a cabo en HSH infectados o no por VIH-1 en San Francisco, y que describen tasas de prevalencia de la infección anal del 88% (Chin-Hong *et al.*, 2008). Un trabajo llevado a

cabo en una cohorte de HSH infectados por VIH-1 en Canadá, describe tasas de prevalencia de infección del 97,9% (de Pokomandy *et al.*, 2009). En Australia, en un trabajo llevado a cabo empleando la técnica de captura de híbridos, se obtuvo una prevalencia de infección anal en HSH infectados por VIH-1 del 84% (Anderson *et al.*, 2008),

En Europa los estudios realizados confirman estos valores, así en el año 2003, Piketty *et al.*, llevaron a cabo un trabajo en Francia con 118 pacientes infectados por VIH-1, de los que 67 eran HSH y 50 hombres heterosexuales usuarios de drogas por vía parenteral, obteniéndose en los HSH un valor de prevalencia de infección anal por VPH-AR del 55%. En el año 2005, en Alemania, Kreuter *et al.*, en 103 HSH infectados por VIH-1 describieron una prevalencia de infección anal del 86%; y más recientemente en Italia, Pierangeli *et al.* en el año 2008, realizaron un estudio en 36 HSH/bisexuales infectados o no por VIH-1, y las tasas de prevalencia de infección en los 27 HSH fueron del 89% y del 94%, en los pacientes no infectados e infectados por VIH-1, respectivamente. En España, los datos de la infección anal por VPH se remontan al año 2006, Sirera *et al.*, publican un trabajo en el que describen las tasas de prevalencia de infección en ano, pene y boca por VPH en 52 HSH y 22 hombres heterosexuales infectados por VIH-1. La prevalencia global de infección anal en la población de estudio fue de 78% (IC95%, 67-87%) siendo del 83% en los pacientes HSH (IC95%, 70-92%). En un estudio realizado en el año 2009 por Ortiz *et al.* en una cohorte abierta, multicéntrica y prospectiva de pacientes infectados por VIH-1 y sin tratamiento con antirretrovirales cuando se incluyen en la cohorte, describen una prevalencia de infección anal por VPH del 88% para HSH.

Los datos de prevalencia de infección anal por VPH descritos en el presente estudio, son ligeramente inferiores que los que se observan en los trabajos anteriormente mencionados. Esta diferencia se debe fundamentalmente a que en la mayor parte de los trabajos, la detección de la infección se realiza mediante la tecnología de PCR, y en el presente trabajo se han descrito valores de prevalencia de infección anal empleando el método de captura de híbridos, que aunque presenta menor sensibilidad, es mucho mayor su especificidad desde el punto de vista clínico. Además, la utilización de la metodología de PCR proporciona datos de infección de VPH tanto de alto como de bajo riesgo, y la técnica de captura de híbridos empleada en este trabajo solo ha permitido la detección de infecciones por tipos de alto riesgo.

Los tipos de VPH-AR más prevalentes en el presente trabajo fueron VPH16 (21,9%), VPH18 (12,1%), VPH51 (10,6%) y VPH45-58 (9,9%), y se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de todos los tipos de VPH en función del

estatus VIH-1 de los pacientes, con la excepción de VPH35, 39 y 45; así en los pacientes no infectados por VIH-1 los tipos más frecuentes fueron VPH16, VPH18, VPH45, VPH51 y en los pacientes infectados VPH16, VPH68, VPH18 y VPH58. Sin embargo, en un estudio realizado por Pierangeli *et al.*, en el año 2008, los autores no describen estas diferencias en la distribución de tipos entre los pacientes infectados y no infectados por VIH-1, aunque este hecho puede ser atribuible a la diferente sensibilidad tipo específica de la metodología utilizada, ya que en este trabajo se empleaba la secuenciación directa de productos de PCR, que detecta el tipo mayoritario y subestima los tipos minoritarios presentes en las coinfecciones. La distribución tipo específica de VPH-AR obtenida entre los pacientes infectados por VIH-1, es similar a la descrita por otros autores. En un estudio realizado en 103 HSH infectados por VIH-1 en Alemania, se describe una distribución muy similar, siendo los tipos más prevalentes el VPH16 seguido de VPH18 y VPH58 (Kreuter *et al.* 2005) y Pokomandy *et al.* en un estudio de cohorte de 247 participantes en Canadá, describen los tipos VPH16, VPH18 y VPH52 como los más prevalentes. En España, Sirera *et al.* en el año 2006 describen una distribución ligeramente diferente a la obtenida en el presente estudio, siendo después del VPH16 (47%) los tipos más prevalentes VPH33-39 (33%) y VPH51-52 (30%). Este hecho puede atribuirse a diferencias en el tamaño muestral (N=52 *vs.* N=401) y a que en la población de estudio se incluían tanto hombres HSH como heterosexuales.

En un estudio llevado a cabo en una cohorte de HSH infectados o no por VIH-1 en Estados Unidos, Chin-Hong *et al.* en el año 2009 describieron que el riesgo de adquisición de VIH-1 incrementaba significativamente al aumentar el número de tipos de VPH aislados en un paciente, y que este hecho puede estar relacionado con la mayor presencia de lesiones anales en los HSH. En el presente estudio, la prevalencia global de infecciones múltiples de VPH-AR (34,9%) fue mayor que la de infecciones simples (16,2%), y se establecieron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las infecciones múltiples entre los pacientes infectados por VIH-1 frente a los no infectados (55,2% *vs.* 24%;  $p < 0,001$ ). Estos datos son similares a los descritos previamente en la bibliografía, en los que se observan mayores tasas de prevalencia de infecciones múltiples en los pacientes infectados por VIH-1. En esta línea, uno de los primeros trabajos llevados a cabo en Estados Unidos, describe una tasa de infección múltiple de tipos de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico del 73% en los pacientes infectados por VIH-1, y del 23% en los no infectados (Palefsky *et al.*, 1998a). Recientemente en Canadá, de Pokomandy *et al.*, en una cohorte de HSH infectados por VIH-1, observan una prevalencia de infecciones

múltiples de VPH del 90,9%. En Europa, un estudio realizado en Francia en pacientes HSH infectados por VIH-1, describe una prevalencia de infección por múltiples tipos de VPH-AR muy similar a la descrita en el presente trabajo (35,8%) (Piketty *et al.*, 2003). En España, Sirera *et al.*, 2006 observaron igualmente una elevada prevalencia de infecciones por múltiples tipos de VPH, tanto de bajo como de alto riesgo oncogénico (81%). Cuando se comparan los valores de la prevalencia de infecciones múltiples obtenidas en el presente trabajo, son inferiores a los descritos previamente en la bibliografía, hecho que puede deberse a que sólo se han tenido en cuenta infecciones múltiples por tipos de alto riesgo oncogénico, y diferencias asociadas a la metodología de detección.

## 5.2. Prevalencia y caracterización molecular de variantes de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33 y VPH52

En el estudio del genoma de VPH16, los genes de expresión temprana y la región reguladora son claves en la patogénesis del virus y en su asociación al desarrollo de cáncer, debido a que regulan varias propiedades, entre las que se incluyen la replicación y la transcripción del ADN viral, así como la inmortalización y la transformación de las células infectadas (Stewart *et al.*, 1996). Se ha demostrado mediante estudios funcionales, que los cambios en la secuencia de estos genes puede llegar a alterar las funciones biológicas de las proteínas que codifican, lo que podría afectar a la historia natural de la infección por VPH16, hecho que podría ser extensivo a otros tipos de VPH. De la misma manera, las variaciones también pueden influir en la persistencia de la infección y la progresión a cáncer invasivo, lo que podría explicar en parte, el amplio espectro de patologías y la alta prevalencia de cáncer cervical en algunos países (Pista *et al.*, 2007). Por lo tanto, la identificación de las variantes tanto de VPH16 como otros tipos de VPH de alto riesgo, tiene entre sus objetivos establecer bases de datos que nos permitan: (i) desarrollar diseños eficaces en las estrategias del diagnóstico y vacunación de la infección; (ii) aplicar a estudios epidemiológicos en los que las variaciones en la secuencia pueden ser utilizadas como marcadores para monitorizar la infección por VPH en diferentes poblaciones; (iii) estudiar las relaciones entre los genotipos y los fenotipos (el hecho de que ciertas variantes se asocien positiva o negativamente con las lesiones, dependiendo de sus propiedades biológicas y funcionales) y (iv) hacer estudios evolutivos y taxonómicos (Stewart *et al.*, 1996).

La mayoría de los trabajos de variantes de VPH han sido llevados a cabo en muestras cervicales, y se han centrado fundamentalmente en pacientes con cáncer. Son mas escasos los trabajos que han estudiado las variantes de VPH en muestras anales tanto

en mujeres como en hombres, aunque se ha demostrado que la displasia anal varía considerablemente con los diferentes tipos de VPH y que las regiones genómicas de elevada variabilidad intratipo, que incluyen las alteraciones nucleotídicas que definen las diferentes variantes, podrían tener una importante relevancia en las propiedades biológicas del virus, estando asociadas a un riesgo variable para carcinoma *in situ* (Melbye *et al.*, 1994a; Palefsky *et al.*, 1994; Critchlow *et al.*, 1995; Steward *et al.*, 1996).

En este trabajo hemos determinado las variantes de los tipos de alto riesgo VPH16, VPH18, VPH31, VPH33 y VPH52 en un grupo de HSH infectados o no por VIH-1, en las regiones genómicas que codifican las dos proteínas virales implicadas en el proceso de transformación e inmortalización celular (E6 y E7) y en una parte de la región reguladora que contiene los elementos implicados en la regulación de la expresión viral, con el fin de analizar la distribución y las características de las variantes de los diferentes tipos de VPH-AR en dicha población, así como valorar el efecto de la coinfección con VIH-1 y el origen geográfico en la distribución de las mismas. Este trabajo, es pionero en España en el análisis de variantes intratipo de VPH-AR asociadas a la infección anal en pacientes HSH infectados y no infectados por VIH-1.

En el presente trabajo, el análisis de los polimorfismos de VPH16 en las tres regiones genómicas estudiadas, ha permitido identificar variantes pertenecientes a tres de las cinco ramas filogenéticas descritas para este tipo de VPH (Yamada *et al.*, 1997), clasificándose el 86,7% de las muestras en la rama Europea, siendo el 48,2% variantes Europeas y el 38,5% secuencias prototipo; el 9,6% se asignaron a la rama Asiático-Americana y el 3,6% a la rama Africana tipo 2. La elevada prevalencia de secuencias pertenecientes a la rama Europea de VPH16, obtenida en nuestro trabajo, coincide con los escasos datos bibliográficos de análisis de variantes en la infección anal en HSH. En el año 1998, Xi *et al.*, publicaron el primer trabajo en el que se demostraba que la infección con diferentes variantes de VPH16 tenía implicaciones en su asociación con el carcinoma anal *in situ*. En dicho estudio, la identificación de variantes se realizó mediante hibridación molecular, en muestras anales de una cohorte de HSH que estaban infectados o no por VIH-1 en Estados Unidos, observándose que las secuencias pertenecientes a la rama Europea eran las más prevalentes (88,9%). En el año 2002, Da Costa *et al.*, evaluaron las variaciones de la región codificante de E6 de VPH16 en muestras anales de mujeres y hombres infectados o no por VIH-1, procedentes de dos estudios de cohortes realizados en Estados Unidos. En el caso de las muestras anales procedentes de los hombres, el 93% eran variantes de VPH16 pertenecientes a la rama Europea.

La distribución de variantes no Europeas obtenida en el presente estudio (mayor prevalencia de variantes clasificadas en la rama Asiático-Americana que de variantes pertenecientes a la rama Africana tipo 2), difiere de la observada en los dos trabajos anteriormente mencionados. Así en el trabajo realizado por el grupo de Xi *et al.*, las variantes Africanas fueron más prevalentes que las Asiático-Americanas (4,4% *vs.* 3,2%), al igual que en el trabajo realizado por Da Costa *et al.* (8,2% *vs.* 1,4%). Estas diferencias pueden asociarse al país de procedencia de los pacientes y/o al origen racial de los mismos.

En Europa, la mayoría de los trabajos de epidemiología molecular de variantes de VPH16 se han llevado a cabo en muestras cervicales y las variantes Europeas se han descrito como las más frecuentes. En un trabajo realizado en Italia en 90 muestras cervicales de pacientes infectados por VPH16, la prevalencia de variantes pertenecientes a la rama Europea fue del 78,8%, correspondiendo el 25,5% a la secuencia prototipo. Las variantes Africanas tipo 1 se detectaron en el 12,2% de los casos y las variantes Asiático-Americanas en el 8,9% (Tornesello *et al.*, 2004). Un trabajo más reciente, también en mujeres italianas, describe una prevalencia extremadamente alta de muestras con secuencias pertenecientes a la rama Europea (98,4%) y sólo se detectó un caso con una variante Asiático-Americana (Cento *et al.*, 2009). En el año 2007, en un estudio realizado en 187 mujeres portuguesas, se describe una prevalencia de infecciones por VPH16 pertenecientes a la rama Europea del 74,3%, detectándose variantes pertenecientes a las ramas filogenéticas Africana tipo 1, Asiático-Americana y Africana tipo 2 en un porcentaje de 11,8%, 9,6% y del 4,3% respectivamente (Pista *et al.*, 2007).

Los datos de la epidemiología molecular de las variantes de VPH en España son escasos. Las primeras aproximaciones resultan de trabajos realizados en los años 90, en el marco de estudios internacionales con colecciones de muestras de pacientes con cáncer cervical procedentes de diferentes países y localizaciones geográficas (Stewart *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1997). En el año 2001, se publican los resultados del análisis de polimorfismos en la región codificante de la proteína E6 de 61 muestras positivas para VPH16, y procedentes de mujeres atendidas en un Centro Hospitalario de Madrid (Perez-Gallego *et al.*, 2001); y en el año 2006, Ortiz *et al.*, describen el análisis de las variantes de VPH16 mediante el estudio de las regiones codificantes de las proteínas E6, E2 y L1 en 75 mujeres procedentes de dos provincias de España (Madrid y Alicante). En ambos estudios, las variantes más prevalentes fueron las que pertenecían a la rama Europea. Perez-Gallego *et al.*, describieron valores de prevalencia de las variantes Europeas del 90,2%; y Ortiz *et al.*,



del 78,7%. Este último estudio, describe además la presencia de variantes no Europeas pertenecientes a las ramas filogenéticas Asiático-Americana, Africana tipo 1 y Africana tipo 2, siendo la prevalencia de cada una de ellas del 16%, 4% y 1,3%, respectivamente. La presencia de variantes pertenecientes a las ramas Asiático-Americanas y Africanas en las poblaciones europeas, puede deberse a los movimientos migratorios hacia Europa desde los países latinoamericanos y africanos, ya que los estudios realizados en dichos países describen una mayor prevalencia de dichas variantes (Berumen *et al.*, 2001; Hildesheim *et al.*, 2001; Piccono *et al.* 2003; Calleja-Macías *et al.*, 2004; Sichero *et al.* 2007; Junes-Gill *et al.* 2008).

La caracterización de las variantes realizada en el presente trabajo se basó en el análisis de los polimorfismos de tres regiones del genoma de VPH. Las oncoproteínas virales son importantes en varias funciones virales, entre las que se incluyen la replicación y la transcripción del ADN viral, la interacción con la red del citoesqueleto, la inmortalización y la transformación celular (Xi *et al.*, 1997). Las variaciones en las secuencias codificantes de las oncoproteínas virales son menores que en la región reguladora (Giannoudis *et al.*, 2001), sin embargo los polimorfismos de sus secuencias tienen importancia debido a que pueden llegar a alterar las funciones biológicas de las mismas y de esta forma afectar al desarrollo clínico de la infección viral (Pillai *et al.* 2009). La región reguladora no codifica para ninguna proteína y está implicada en el control de la replicación y la transcripción viral. La expresión de los genes virales está bajo el control de los promotores y elementos potenciadores de la transcripción localizados en esta región, que además contiene los sitios de unión de factores de transcripción celulares, que pueden modular sus funciones positiva o negativamente (Desaintes *et al.* 1996). La región reguladora es muy variable, lo que permite llevar a cabo una clasificación más exacta de las variantes que se describen en ella (Ho *et al.* 1991; Chan *et al.* 1992; Ong *et al.* 1993; Giannoudis *et al.* 2001). En el caso concreto del tipo 16, ciertos estudios han demostrado que los polimorfismos de la región reguladora del genoma pueden estar asociados con un riesgo elevado de persistencia de infección o de inducir lesiones (Xi *et al.* 1997; Veress *et al.* 1999; Giannoudis *et al.* 2001; Hildesheim *et al.* 2001).

Las variantes de VPH16 más frecuentes, fueron aquellas que presentaron la mutación en la región codificante de la proteína E6 en posición 350(T→G) y la mutación en la región reguladora en posición nucleotídica 7521(G→A). La mutación descrita en la región codificante de E6, que caracteriza la clase E-350G de la rama Europea, da lugar a un cambio de Leucina a Valina en el aminoácido en posición 83 de la proteína (L83V). Esta

mutación, se describió en variantes pertenecientes a la rama Europea y Asiático Americana, pero no en las variantes pertenecientes a la rama Africana tipo 2. Estos datos coinciden con los datos bibliográficos publicados en estudios llevados a cabo en diferentes localizaciones geográficas y tanto en muestras cervicales como anales (Xi *et al.*, 1998; Da costa *et al.*, 2002; De Boer *et al.*, 2004; Tornesello *et al.*, 2004; Junes-Gill *et al.*, 2008; Pillai *et al.*, 2009; Cento *et al.*, 2009). Con respecto a la asociación de esta mutación con cáncer, los datos bibliográficos son contradictorios, algunos estudios llevados a cabo en mujeres inglesas, suecas o indias describen una prevalencia elevada de esta mutación en las muestras procedentes de pacientes con cáncer cervical, proponiendo los autores que esta mutación podría estar relacionada con la persistencia viral (Zehbe *et al.*, 1998b; Giannoudis *et al.*, 2001; Kammer *et al.*, 2002; Pillai *et al.*, 2009); sin embargo en otros trabajos realizados en mujeres en Alemania, Holanda, China o Brasil la presencia de variantes con dicha mutación se observa tanto en mujeres con cáncer cervical, como en aquellas con lesiones intraepiteliales de alto y bajo grado (Bontkes *et al.* 1998; Nindl *et al.* 1999; Chan *et al.* 2002; Junes-Gill *et al.* 2008). Además, Zehbe *et al.* en el año 2001, en mujeres italianas, describieron un menor riesgo de desarrollo de cáncer cervical en pacientes con dicha mutación. Los estudios funcionales llevados a cabo en relación a la mutación L83V, describen que en las variantes que muestran tal mutación en la proteína se observan niveles de actividad de degradación de Bax (proteína celular proapoptótica) y de unión de la proteína mayores cuando son comparados con la proteína prototipo. Esta mutación es un ejemplo de que ciertas mutaciones pueden por tanto alterar actividades de la proteína importantes en el potencial carcinogénico. Las variaciones de la oncogenicidad que se han descrito, pueden ser debidas a diferencias genéticas entre las poblaciones (diferencias geográficas) o la presencia simultánea de otras co-mutaciones (Lichtig *et al.*, 2006; Pillai *et al.*, 2009).

La mutación en la posición nucleotídica 7521(G→A) de la región reguladora, se identificó en variantes pertenecientes a las tres ramas filogenéticas, Europeas, Asiático-Americanas y Africanas tipo 2. Esta posición, localizada en el segmento central de la región reguladora, contiene el potenciador específico de tejido de la transcripción y los diferentes estudios de variaciones de la región, indican que esta posición mutada es el cambio en la secuencia más frecuente en el mundo, siendo especialmente común en Europa (Ho *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1997; Kurvinen *et al.*, 2000; Villa *et al.*, 2000b; Tornesello *et al.*, 2004; Alencar *et al.*, 2007; Junes-Gill *et al.*, 2008; Cento *et al.* 2009; Pillai *et al.*, 2009). Las variantes que incluyen dicha posición mutada alteran los sitios de unión de

los factores de transcripción YY1, NF1, aunque los pocos estudios que existen se han centrado en los efectos que tales mutaciones tienen en la actividad de YY1. El factor YY1 es un miembro de la familia de reguladores de la transcripción relacionados con los tumores, conocidos por estar implicados en el desarrollo mamario y en la diferenciación celular pero además, porque pueden jugar un papel en el establecimiento y progresión de ciertos tipos de tumores (Austen *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1999; Krippner-Heidenreich *et al.*, 2005). Algunos trabajos han descrito que mutaciones o deleciones de la región que dan lugar a la pérdida de los sitios de unión de dicho factor, conllevaban una potenciación de la actividad transcripcional y que dichas variaciones se aislaban muy frecuentemente en las muestras de pacientes con cáncer cervical (Dong *et al.*, 1994, 1999; May *et al.*, 1994). Sin embargo, en un estudio realizado en el año 2005 por Kim *et al.*, y analizando las variaciones en la región reguladora de diferentes variantes de E7 de VPH16 los autores sugieren que las diferencias observadas en la secuencia de la región reguladora que afectaban a la unión de ciertos factores de transcripción, incluidos YY1, TEF-1 y GRE, se correlacionaban con una actividad transcripcional igual o menor cuando eran comparadas con la secuencia prototipo y que por tanto, tales diferencias no estaban relacionadas con el potencial oncogénico de las variantes. Otros estudios posteriores, han confirmado estos resultados e indican que estas variaciones de la secuencia de la región reguladora de VPH16 que afectan a YY1, no se asocian comúnmente con un riesgo de progresión de las lesiones a un estadio más severo (Kurvinen *et al.*, 2000; Veress *et al.*, 2001).

En el presente estudio no se han descrito variantes nuevas de VPH16 pertenecientes a la rama Europea. Sin embargo, se han identificado variantes con cambios poco frecuentes en esta rama filogenética. La variante representada por la secuencia SP4193 presentó una mutación en la posición nucleotídica 176 de guanina a citosina, que implica un cambio de un aminoácido neutro (Glutamina) a un aminoácido con polaridad positiva (Histidina). En esta posición nucleotídica, el cambio más frecuente es una transición de guanina a adenina, que a pesar de ser una mutación con sentido, tanto el aminoácido de la proteína nativa como el de la proteína mutante tienen la misma polaridad. La variante representada por la secuencia SP3946 se caracterizó por presentar un cambio en la posición nucleotídica 132 de la región codificante de E6 de guanina a citosina, que aún habiéndose descrito previamente en variantes pertenecientes a la rama Europea, es más frecuente en las variantes de la rama Africana tipo 1.

Todas las variantes de VPH16 pertenecientes a la rama Asiático-Americana presentaron, además del cambio en la posición nucleotídica 350 ya descrita, mutaciones en las posiciones nucleotídicas 145 y 335 de la región codificante de E6, que están incluidas en regiones responsables de la unión y degradación de la proteína p53 y la transactivación transcripcional de la proteína (Pillai *et al.* 2009). No son muchos los estudios llevados a cabo para conocer el efecto biológico que las variaciones pueden llegar a tener en las funciones de las proteínas y el potencial carcinogénico. Los estudios realizados se han dirigido a ensayar los efectos en funciones como la degradación de p53, la degradación de Bax y la inhibición de la transactivación de p53 de la proteína E6, e indican que en la mayoría de los casos las variantes con cambios en las regiones implicadas en tales funciones no muestran importantes reducciones de la actividad con respecto a la proteína prototipo, indicando la gran importancia que estas actividades tienen en el proceso carcinogénico (Lichtig *et al.*, 2006). Sin embargo, existen algunas excepciones como la descrita por Foster *et al.*, que indican que los mutantes con delecciones de los aminoácidos nueve a 13 o la presencia simultánea de las mutaciones de los aminoácidos ocho, nueve y diez de la proteína de VPH16 anulan totalmente su capacidad de inducir la degradación de p53 (Foster *et al.*, 1994). En otro estudio, una variante con la mutación K11E, mostró una incapacidad absoluta de unirse y degradar la proteína p53 en los estudios *in vivo* e *in vitro* llevados a cabo en queratinocitos humanos (Cooper *et al.*, 2003). Un trabajo reciente muestra que las variantes relacionadas con la mutación L83V, como la variante Asiático-Americana con los cambios Q14H/H78Y/L83V, que en nuestro trabajo está presente en todas las muestras de esta rama, son más prevalentes que la proteína prototipo en las lesiones precancerosas y en cáncer cervical (Zehbe *et al.*, 2009).

Los trabajos llevados a cabo en la región reguladora de VPH16 para estudiar la actividad del promotor temprano en las diferentes variantes, indican que las variantes pertenecientes a la rama Asiático-Americana muestran unos valores de actividad hasta tres veces mayores que los detectados en las variantes de las ramas Europeas y Africanas, y que este hecho puede ser atribuido principalmente a la presencia de la transición A→C en la posición nucleotídica 7729 de la región reguladora, característica de la rama (Kämmer *et al.*, 2000). El efecto que el incremento de la actividad de promotor puede tener es desconocido aún, pero podría estar implicado en la mayor probabilidad de progresión a un fenotipo maligno que se ha descrito en las variantes de esta rama, ya que la expresión de las oncoproteínas virales esta mediada por el promotor temprano. Todas las variantes pertenecientes a la rama Asiático-Americana en el presente estudio presentaron la

mutación anteriormente descrita. En esta rama se identificó una nueva variante (representada por la secuencia SP6085), que se caracterizó por presentar en la región reguladora una transición que no había sido descrita previamente en la posición nucleotídica 7784 (C→T) y que fue la más frecuentemente detectada.

Las variantes de la rama Africana fueron las únicas que presentaron cambios en la secuencia de nucleótidos de la región codificante de E7 que indujeron cambio del aminoácido correspondiente (N29S). Este cambio se localiza en una zona de la proteína implicada en funciones inmunogénicas. En un estudio llevado a cabo en Korea, esta mutación se localizó en el 70% de los carcinomas cervicales invasivos (Song *et al.* 1997).

El estudio de la región codificante de la proteína E7 en diferentes grupos de poblaciones, ha sugerido que esta región está altamente conservada para VPH16 (Eschle *et al.*, 1992; Fujinaga *et al.*, 1994). La escasez de mutaciones en la región codificante de E7 de VPH16 sugiere una selección positiva evolutiva, lo que puede estar relacionado con las propiedades carcinogénicas únicas de VPH16 (Safaeian *et al.*, 2010). De acuerdo con estos resultados, en nuestro trabajo también encontramos que la región codificante de la proteína E7 (1,7%) es más conservada cuando se comparó con la región codificante de la proteína E6 (3,1%), y ninguna de las variaciones nucleotídicas en esta región se describían por primera vez. Sin embargo, algunos estudios realizados en muestras procedentes de mujeres de Japón, Indonesia, Korea y China han descrito una alta frecuencia de mutaciones en la región codificante de E7.

De la misma manera que el estudio de las variantes de VPH16, la mayor parte de los estudios de las variantes de VPH18 se han centrado en muestras cervicales de pacientes con cáncer (Villa *et al.*, 2000; Burk *et al.*, 2003; De la Cruz-Hernández *et al.*, 2005; De Boer *et al.*, 2005; Lizano *et al.*, 2006; Xi *et al.*, 2006; López-Saavedra *et al.*, 2009) y hasta la fecha no hay trabajos en los que se hayan descrito las variantes en la infección anal, y más concretamente en HSH. Las variantes de VPH18 en nuestro trabajo se clasificaron en las tres ramas filogenéticas descritas para este tipo, 78,3% en la rama Europea, 8,7% en la rama Africana y 6,5% en la rama Asiático-Amerindia.

Los trabajos de la distribución de las variantes de VPH18 describen la rama filogenética Europea como la más prevalente en general, pudiendo variar la distribución de las ramas Asiático-Amerindia y Africana en función de las diferentes localizaciones geográficas de estudio. En el año 2004, Calleja-Macías *et al.*, llevan a cabo el estudio de los polimorfismos intratipo de VPH18 en muestras de mujeres procedentes de México, representando las variantes de la rama Europea el 87% de los casos, y el 13,3% restante

pertenecían a la rama Africana. En el año 2005, Arias-Pulido *et al.*, en un estudio realizado en muestras procedentes de mujeres de Estados Unidos, describen las variantes Europeas como las más prevalentes (48%), seguidas de las variantes Asiático-Amerindias (30%) y las variantes africanas (22%). En el año 2006 en Estados Unidos, se realizó un estudio de caracterización de variantes de VPH16 y VPH18 en 1.114 mujeres que presentaban lesiones intraepiteliales. Las variantes Europeas de VPH18 fueron las más frecuentes (43,1%), seguidas de las variantes Asiático-Amerindias y las variantes Africanas que se distribuyeron homogéneamente (28,6%; 28,3%) (Xi *et al.*, 2006). Un trabajo llevado a cabo en una cohorte de mujeres de Brasil, identificó las variantes Europeas como las más prevalentes (80%), seguida de las variantes Africanas (13,3%) y por último las variantes Asiático-Amerindias (6,7%) (Sichero *et al.*, 2007). En los países europeos, el estudio de las variantes de VPH18 es más escaso, y en un trabajo realizado en Portugal en el año 2007, la distribución de variantes fue ligeramente diferente a la observada en el presente trabajo, ya que las variantes de las ramas Europea y Africana se identificaron con la misma frecuencia (39%) y las variantes de la rama Asiático-Amerindia se identificaron en el 22% de las muestras estudiadas, debido posiblemente a la mayor heterogenicidad étnica de la población portuguesa, descrita por los autores (Pista *et al.*, 2007).

En el presente estudio, ninguna de las muestras analizadas fue clasificada como variante prototipo de VPH18, y solo dos variantes se clasificaron en la rama Asiático-Amerindia. Ambas variantes, presentaron uno o dos cambios en la región reguladora que ya habían sido publicados en trabajos previos, y que hasta la fecha, no se ha descrito que puedan afectar al sitio de unión de algún factor de transcripción (Burk *et al.*, 2003; Callejas-Macías *et al.*, 2004; Arias-Pulido *et al.*, 2005; De Boer *et al.*, 2005; Pista *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2008).

En este estudio, se han identificado seis nuevas variantes de VPH18 pertenecientes a la rama Europea, de acuerdo a la presencia de nuevas mutaciones en la región codificante de E6 y en la región reguladora, bien en posiciones que no se habían descrito en esta rama (SP4286, SP5289) o en posiciones nuevas (SP3754, SP5126, SP6270, SP6268). Entre las sustituciones nuevas descritas en la región reguladora las posiciones nucleotídicas 7527 y 7699, afectaron a los lugares de unión de los factores de transcripción C/EBP, Oct-1, YY1 y TEF-1 y la posición nucleotídica 314 de la región codificante de E6, dio lugar al único cambio de aminoácido descrito en esta proteína en las variantes de la rama Europea y correspondió al codón en posición 70 (D70E). La variante más frecuente de la rama Europea fue la representada por la secuencia SP5876, y los cambios que la

caracterizaron en las regiones codificantes y que fueron característicos de todas las variantes Europeas, dieron lugar a mutaciones silenciosas en las oncoproteínas. De la misma manera, en la región reguladora, las mutaciones descritas en las variantes Europeas no alteraron el sitio de unión de ningún factor de transcripción, excepto en aquellas variantes que presentaban mutaciones en posiciones descritas por primera vez.

Se identificaron dos variantes pertenecientes a la rama Africana que se diferenciaron entre ellas en una posición nucleotídica de la región reguladora. En la región codificante de E6, dichas variantes sólo presentaron dos mutaciones que dieron lugar cambios en la secuencia proteica (H80Y, N129K); y como se esperaba por ser uno de los genes más conservados de los VPH, sólo las variantes de esta rama presentaron mutaciones asociadas a cambios en la secuencia de la proteína E7. Todos los polimorfismos detectados en las variantes pertenecientes a esta rama ya habían sido descritos previamente, (Callejas-Macías *et al.*, 2004; Arias-Pulido *et al.*, 2005; De Boer *et al.*, 2005; Pista *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2008).

Son muy escasos los trabajos que han caracterizado el significado funcional y las implicaciones en el potencial el potencial carcinogénico de los polimorfismos intratipo de VPH18. La mutación en el codón 129 de la región codificante de E6, incluida en las variantes asignadas a la rama Africana, está altamente conservada en los tipos de alto riesgo oncogénico, sin embargo un trabajo publicado en el año 2005, realizando experimentos *in vitro* para clarificar los efectos de dicha mutación, ha demostrado que este cambio en la región codificante de E6, no afecta a su capacidad para degradar la proteína p53. En este trabajo se describe que la mutación de la posición nucleotídica 491 de la región codificante de E6 de las variantes asignadas a la rama Africana, invierte el patrón de transcripción de la proteína E6 y consecuentemente, muestra un incremento en los niveles de p53, lo que podría explicar en parte, el comportamiento menos agresivo propuesto en las variantes de VPH18 de esta rama (De la Cruz *et al.*, 2005).

La infección con variantes no Europeas de VPH16 y VPH18 muestra una tendencia general a estar más asociada con lesiones intraepiteliales de alto grado y cáncer cervical, como muestran los trabajos llevados a cabo en diferentes localizaciones en el mundo (Lizano *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 1997; Zehbe *et al.*, 1998b; Villa *et al.*, 2000; Hildesheim *et al.*, 2002; Tornesello *et al.*, 2004, 2008b; De Boer *et al.*, 2005 Xi *et al.*, 2006, 2007; Pista *et al.*, 2007; Sichero *et al.*, 2007). En el año 1996 Xi *et al.* observaron que las variantes no prototipo de VPH16 estaban más frecuentemente asociadas con el desarrollo de lesiones cervicales que las variantes prototipo. El mismo grupo de investigadores en el año 1998, observaron

resultados similares en una serie de muestras de carcinomas anales, en las que las variantes no prototipo fueron más prevalentes que las variantes prototipo de VPH16 (Xi *et al.*, 1998). Tras estas observaciones y dado que la variante prototipo de VPH16 pertenece a la rama Europea en base a su relación geográfica y filogenética, Villa *et al.* establecieron como hipótesis en un estudio que realizaron en el año 2000, que las diferencias en la atribución del riesgo entre variantes no prototipo o prototipo descritas en diferentes trabajos, podrían ser indicativas de claras diferencias en la capacidad para inducir carcinogénesis para los tipos de alto riesgo oncogénico de las diferentes áreas geográficas. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo en una cohorte de mujeres en Brasil, corroboraron los datos anteriores al describir que las infecciones con las variantes no Europeas de VPH16 y VPH18 tenían una tendencia general a persistir más frecuentemente y a estar más asociadas con lesiones pre-invasivas (Villa *et al.*, 2000). Estudios posteriores han confirmado estos resultados en las variantes no Europeas de VPH16, especialmente para las variantes Asiático-Americanas, que no sólo tienen más tendencia a persistir sino que están también más asociadas con un riesgo mayor de desarrollo de lesión cervical, como indican estudios de cohortes llevados a cabo en Brasil y Estados Unidos (Sichero *et al.*, 2007; Xi *et al.*, 2007). Los resultados para las variantes Asiático-Americanas de VPH16 en otros países latinoamericanos como México (Berumen *et al.*, 2001; Del Refugio *et al.*, 2004) o Costa Rica (Hildesheim *et al.*, 2001) son similares, al detectar frecuencias más elevadas y estadísticamente significativas de estas variantes en pacientes con cáncer cervical. En el caso concreto de México, los autores describen que las clases a/c de las variantes Asiático-Americanas se localizan con mayor frecuencia en pacientes con cáncer y en mujeres jóvenes con tumores más agresivos, siendo muy baja la frecuencia con la que se localizan las variantes Asiático-Americanas en los casos controles. En Europa, los datos obtenidos de los trabajos que se han realizado en Italia y en Portugal, confirman también que la frecuencia de las variantes no Europeas aumenta notablemente con la severidad de la lesión, sugiriendo este papel más relevante en la oncogenicidad (Tornesello *et al.*, 2004, 2008b; Pista *et al.*, 2007). Estos datos pueden corroborar la hipótesis de que la elevada incidencia de cáncer cervical observada en África y Latinoamérica, podría estar asociada con la presencia de variantes de VPH16 diferentes a la variante Europea o prototipo (Pista *et al.* 2007). Aún con lo anteriormente descrito, los datos son contradictorios, ya que algunos estudios apuntan que no existe tal asociación (Schlecht *et al.*, 2005; Rajeevan *et al.*, 2005; Beskow *et al.*, 2005) y que las diferencias en estos resultados podrían reflejar las diferencias genéticas entre las poblaciones, en concreto polimorfismos genéticos del



complejo mayor de histocompatibilidad, o deberse al predominio de las variantes Europeas en las poblaciones de estudio (Zehbe *et al.*, 1998a; Zehbe *et al.*, 2001; Beskow *et al.*, 2005).

En el caso de VPH18, los resultados de los trabajos realizados son similares y la infección con ciertas variantes tiene una tendencia general a estar asociada con lesiones pre-invasivas y cáncer cervical. Cuando se estudia la distribución de las variantes de VPH18 en diferentes tipos histológicos de cáncer cervical así como en lesiones premalignas y epitelio normal, las asociaciones descritas llevan a considerar que las variantes de este tipo viral tienen comportamientos biológicos diferentes, como se describe en VPH16. Por ejemplo, la variante Africana de VPH18 se ha localizado, exclusivamente en carcinoma celular escamoso, a diferencia de las variantes Europeas y Asiático-Amerindias, que se han localizado en otros tipos histológicos de cáncer cervical (adenocarcinoma, tumores neuroendocrinos) que presentan un peor pronóstico clínico. Las variantes Europeas, en concreto, muestran una mayor tendencia a persistir, y las variantes Asiático-Amerindias tienen mayor capacidad de inducir la formación de tumores *in vivo* (Burk *et al.*, 2003; De Boer *et al.*, 2005; De la Cruz-Hernández *et al.*, 2005; Lizano *et al.*, 2006; Xi *et al.*, 2006, 2007; Pista *et al.*, 2007; Sichero *et al.*, 2007).

Existen pocos trabajos en los que se describen los polimorfismos genéticos para tipos de alto riesgo diferentes de VPH16 y VPH18, debido a la baja prevalencia con la que se observan en lesiones precursoras de cáncer y en cáncer, por lo que el análisis y discusión de los resultados de variabilidad obtenidos en los tipos VPH31, VPH33 y VPH52 incluidos en el presente estudio han sido más limitados (Calleja-Macías *et al.*, 2004, 2005; Raiol *et al.*, 2009). La prevalencia global de infecciones por VPH31 en nuestra población ha sido del 7,3%, muy similar a la descrita en un trabajo llevado a cabo en una cohorte de mujeres canadienses infectadas o no por VIH-1 (Gagnon *et al.*, 2005). El análisis de las variantes de las muestras de pacientes infectados por VPH31, nos permitió identificar la secuencia prototipo (17,2%) y ocho variantes más, siendo la variante más frecuente la representada por la secuencia SP4031 que incluyó un cambio único en la posición nucleotídica 743 de la región codificante de E7, y que dio lugar a un cambio de aminoácido básico (Lisina) a ácido (Ácido Glutámico) en el codón en posición 62. Este cambio además, fue descrito en el resto de variantes identificadas en este trabajo, así como en otros trabajos de polimorfismos de este genotipo viral (Calleja-Macías *et al.*, 2004; Safaeian *et al.*, 2010). Todos los cambios identificados, en las variantes analizadas, en las tres regiones habían sido descritos previamente, con la única excepción de la posición nucleotídica 7534, que

dio lugar a una nueva variante representada por la secuencia SP3400, y que altera el sitio de unión de SRY. La variación identificada en la posición nucleotídica 7659 en la región reguladora, da lugar a la alteración de un sitio de unión de C/EBP y SRY que ha sido descrita en VPH52 (Aho *et al.*, 2003), sin embargo no se identifica con frecuencia en VPH31. En los escasos estudios de este tipo llevados a cabo en mujeres, la variante prototipo (21,9%) es la que se detecta con más frecuencia (Gagnon *et al.*, 2005), aunque la diferencia podría deberse al tipo de muestras y la población de estudio. En el análisis de las variantes de VPH33, se obtuvieron además de la secuencia prototipo, nueve variantes más. La variante prototipo fue la más prevalente (36,4%), de la misma manera que en los escasos trabajos de variantes que se han llevado a cabo para este tipo (Gagnon *et al.*, 2004; Khouadri *et al.*, 2006). Le siguió en frecuencia la variante representada por la secuencia SP3614, que presentó el mayor número de cambios en las tres regiones analizadas (13) incluyendo la delección de la secuencia en tándem de 79 pb localizada en la posición 7596 de la región reguladora. Esta delección se ha identificado en otras dos variantes de VPH31 (SP4570 y SP4510). La presencia de esta repetición perfecta en tándem después de un posible origen de replicación en la región reguladora, es una característica única de VPH33. En la secuencia original (Cole *et al.*, 1989) y en trabajos posteriores (Gagnon *et al.*, 2004; Khouadri *et al.*, 2006) se ha descrito la repetición con un tamaño de 78 pb, pero un análisis exhaustivo de la misma en secuencias descritas previamente y disponibles en bases de datos de secuencias internacionales, nos ha permitido establecer que el tamaño de la repetición en la secuencia corresponde a 79 pb y no a 78 pb como se definió inicialmente. En un principio se sugirió que la repetición localizada corriente arriba del promotor, podría actuar como un potenciador de la transcripción (Seif *et al.*, 1979; Benoist *et al.*, 1981; Cole *et al.*, 1989). Sin embargo, otros trabajos llevados a cabo en otros tipos virales (SV40) han mostrado que las repeticiones en tándem similares tienen un efecto opuesto (Nakagoshi *et al.*, 1990), posiblemente por la competición entre la proteína c-myc y los transactivadores. Son necesarios más estudios funcionales para describir el posible efecto que esta delección tiene al nivel de la transcripción viral; aunque en un trabajo realizado en el año 2004 en una cohorte de mujeres infectadas y no infectadas por VIH-1, los autores describen una asociación entre la presencia de esta delección y la persistencia de la infección por VPH33 (Gagnon *et al.* 2004). En el presente trabajo, se han identificado dos nuevas variantes de VPH33 (representadas por las secuencias SP5818 y SP4046), que se caracterizan por presentar cambios en dos posiciones no descritas previamente en la

región codificante de E6 y en la región reguladora. Los cambios presentes en la región codificante de E6 dieron lugar a dos mutaciones en la secuencia proteica.

El análisis de las 22 muestras infectadas por VPH52, nos permitió identificar la secuencia prototipo y 13 variantes más. La variante prototipo se describió como la más frecuente (36,4%), al igual que en otros trabajos publicados de polimorfismos en este genotipo viral (Aho *et al.*, 2003, 2004; Calleja-Macías *et al.*, 2005; Gagnon *et al.*, 2007). Con la excepción de la variante prototipo y la variante nueva representada por la secuencia SP6187, todas las variantes descritas en el presente estudio se identificaron en muestras individuales. En cuatro de las 14 variantes de VPH52, se observaron deleciones en la región reguladora que están localizadas en una región asociada a sitios de unión para el factor de transcripción AP-1. El efecto que estas deleciones podrían tener en el potencial carcinogénico de VPH es desconocido, aunque los estudios llevados a cabo para el factor de transcripción AP-1, indican que tiene un papel central en la regulación de ciertos tipos de VPH tales como VPH16 y VPH18. En el caso concreto de algunos trabajos, se observan niveles alterados en las actividades de unión y expresión de este factor de transcripción y miembros de esta familia (c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) en cáncer, indicando que puede tener un papel importante en el proceso carcinogénico (Prusty *et al.*, 2005; De Wilde *et al.*, 2008).

La mayoría de las variantes de VPH52 descritas en este trabajo, muestran mutaciones en la región reguladora, siendo uno de los cambios más frecuentes, la alteración de los sitios de sitio de unión de la proteína C/EBP. Un trabajo realizado en el año 2004, describe la asociación de este hecho con la persistencia de la infección con VPH52, por extensión de los resultados obtenidos en un estudio funcional llevado a cabo en el tipo 18 empleando como modelo células HeLa (Bauknecht *et al.*, 1998). Este trabajo indica que la sobreexpresión de C/EBP reprime la región reguladora, y específicamente, interfiere con la unión de la proteína a la caja TATA de la región reguladora de VPH18 (Aho *et al.*, 2004). Esta mutación también está descrita en VPH33, pero como en el caso de VPH52 son necesarios estudios funcionales en estos tipos virales, para conocer el efecto que estas alteraciones pueden tener en la historia natural de la infección y en el proceso carcinogénico. En la región codificante de E6 se ha descrito la variación en la posición nucleotídica 350, identificada en las variantes Europeas de la clase E-350G de VPH16 y asociada en este tipo con la persistencia viral y el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical. En VPH52, el cambio dio lugar a una mutación sin sentido, por lo que posiblemente no tiene las mismas implicaciones biológicas y fue detectada con una

frecuencia menor que en el caso de VPH16. En el análisis de variabilidad intratipo de VPH52, se identificaron tres variantes nuevas, de acuerdo a mutaciones en la región reguladora y en la región codificante de E6, aunque en esta última el cambio en la posición nucleotídica 332, no dio lugar a un cambio de aminoácido.

Los trabajos llevados a cabo para estudiar el efecto que los polimorfismos detectados en las variantes de los tipos de VPH31, 33 y 52 tienen en las propiedades biológicas y bioquímicas del virus y su implicación en el proceso carcinogénico son muy escasos, y los resultados varían según el tamaño muestral, el origen de la población y si las muestras pertenecen a pacientes que estaban o no infectados por VIH-1. En el año 2004 un grupo de Canadá, publicó dos trabajos en los que se describía por primera vez la persistencia de infección para VPH52 y los polimorfismos de VPH33 y VPH35 respectivamente, en una cohorte de mujeres reclutadas durante el período de 1993-2000. La comparación de los resultados permitió establecer que las mujeres infectadas por variantes no prototipo de VPH52, tenían más probabilidad de tener una infección persistente cuando se comparaban con mujeres que estaban infectadas por la variante prototipo (Aho *et al.*, 2004). Un análisis similar se llevó a cabo en las mujeres infectadas por VPH33 y VPH35 y los resultados proporcionaron evidencia epidemiológica de que las variantes de estos tipos diferían en su capacidad de inducir una infección persistente, y las mujeres con una infección persistente estaban infectadas más frecuentemente por las variantes no prototipo (Gagnon *et al.*, 2004; Aho *et al.*, 2004). Los resultados de estos trabajos indicaron una tendencia de las variantes no prototipo en otros tipos diferentes de VPH16 y VPH18, a inducir persistencia de la infección y, estar potencialmente asociadas a la presencia de lesiones cervicales. En el año 2001 Xin *et al.*, estudiaron las variaciones en la proteína E6 en los tipos VPH33, 52 y 58 en mujeres japonesas con neoplasia intraepitelial cervical y cáncer cervical invasivo. Los resultados del trabajo describieron una distribución de variantes que difería según el tipo estudiado, así para VPH33 las variantes se observaron más frecuentemente en las mujeres que presentaban CIN I/II que en los casos de CIN III/cáncer cervical invasivo (71% *vs.* 15%;  $p = 0,02$ ). Las variantes de VPH52 se detectaron en el 98% de los casos y en el tipo VPH58 fue la variante prototipo la mayoritaria, detectándose en el 98% de las muestras infectadas por dicho genotipo viral. Esto puede sugerir que la relación entre las variaciones en la región codificante de E6 y el potencial oncogénico puede ser tipo específico.

La mayor variabilidad descrita en este trabajo en la región reguladora fue en VPH33, de acuerdo con la presencia en ciertas variantes de la delección de 79 pb y la menor

variabilidad correspondió a VPH31, como se ha observado en otros trabajos realizados en este genotipo viral (Gagnon *et al.* 2004; Safaeian *et al.* 2010). Para el resto de tipos descritos en este trabajo, las variabilidades descritas en esta región fueron muy similares entre ellos (VPH16 5,2%; VPH18 5,8%; VPH52 4-5,6%). En las regiones codificantes de E6 y E7, la variabilidad fue muy similar entre los distintos tipos estudiados, y menor que cuando se comparó con la región reguladora, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en el caso de la región codificante de E7. En dicha región además, se observaron los valores de variabilidad menores, indicando que la región está muy conservada en los diferentes tipos de VPH. Entre los tipos estudiados no se encontraron inserciones, y las deleciones descritas sólo se observaron en la región reguladora. Los datos de variabilidad de las regiones analizadas presentados en el presente estudio, están en la línea con los que describen los trabajos realizados anteriormente en muestras cervicales (Giannoudis *et al.*, 2001; Aho *et al.*, 2003, 2004; Gagnon *et al.*, 2004; Tornesello *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Pista *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2008).

En VPH16 no se describió la presencia de infecciones múltiples por diferentes variantes o variantes recombinantes con diferente asignación filogenética en las diferentes regiones analizadas. Yamada *et al.*, en 1997, en un trabajo exhaustivo de análisis de las variantes de VPH16, describen la presencia de infecciones por más de una variante como un hecho bastante infrecuente (0,7%). Algunos autores han sugerido que VPH establece una infección persistente en la que una única variante de VPH puede detectarse o predominar, y que la co-infección con variantes adicionales de VPH16, en los pocos casos que se llega a detectar, es en poblaciones minoritarias (Wheeler *et al.*, 1997; Yamada *et al.* 1997; Mayrand *et al.* 2000; Arias-Pulido *et al.*, 2005). Los trabajos realizados en otros tipos de VPH, que incluyen VPH31, 33, 35 y 52 han descrito resultados similares en la detección de presencia de infecciones por más de una variante, entre los que no se han observado nunca o son poco comunes (Aho *et al.*, 2004; Gagnon *et al.*, 2004, 2005). Un estudio llevado a cabo en variantes de VPH18 (Arias-Pulido *et al.*, 2005), describe datos similares, y las infecciones mixtas de variantes se detectaron en una frecuencia muy baja (1%). En un trabajo llevado a cabo en una cohorte de mujeres infectadas y no infectadas por VIH-1 e infectadas por VPH16 y VPH18, la frecuencia con la que se detectaron infecciones con más de una variante fue un poco mayor en mujeres infectadas por VIH-1, en VPH16 se detectaron con una frecuencia del 6% y en VPH18 con una frecuencia del 1,2% (Schlecht *et al.*, 2005). En el presente trabajo, se ha descrito la presencia de infecciones por más de una variante en tres muestras de VPH18, al asignarse a más de una línea filogenética en las

diferentes regiones analizadas (6,5%). Si este hecho es superior en los individuos inmunodeprimidos por la presencia del VIH-1, puede potencialmente proporcionar un modelo para la protección inmunológica. Sin embargo en el presente estudio, el reducido número de muestras con infecciones por una mezcla de variantes no permite extraer conclusiones, y son necesarios estudios con un mayor tamaño muestral para conocer la posible asociación de este hecho con la coinfección por VIH-1.

### 5.3. Influencia de la coinfección por VIH-1 en la distribución de variantes de tipos de VPH de alto riesgo

Los escasos trabajos de variantes realizados en pacientes infectados por VIH-1 se han realizado en la mayoría de los casos, en muestras cervicales, con la excepción de algunos trabajos de muestras anales. En el año 1992, Icenogle *et al.*, llevaron a cabo un trabajo en Zaire de los polimorfismos del gen *l1* de VPH16 en mujeres infectadas o no por VIH-1. Los resultados del estudio describieron una distribución similar de las variantes entre pacientes infectados y no infectados por VIH-1, aunque en este estudio el tamaño muestral fue muy pequeño (N = 20). En el año 2004, Chatuverdi *et al.*, realizaron un estudio de las variantes de la región codificante de E6 de VPH16 en mujeres de Estados Unidos infectadas o no por VIH-1. En ambos grupos de estudio se describieron las variantes de la rama Europea como las más prevalentes, con una frecuencia del 57,9% y del 54,6%, respectivamente. Los autores del trabajo, describen entre las variantes de la línea Europea, una prevalencia significativamente mayor de la mutación en la posición nucleotídica 350 en las mujeres infectadas por VIH-1, y una tendencia incrementada de la prevalencia de las variantes Asiático-Americanas en las mujeres infectadas por VIH-1. En el año 2005, Schlecht *et al.*, determinaron la distribución de variantes en la región codificante de E6 de los genotipos virales 16 y 18, en una cohorte de mujeres infectadas o no por VIH-1 también norteamericanas. En ambos grupos de estudio, las variantes Europeas fueron las más prevalentes, con valores muy similares (63-69%). En VPH18, entre las mujeres no infectadas por VIH-1, las variantes más frecuentes pertenecieron a la rama Europea (58%), sin embargo en las mujeres infectadas por VIH-1, las variantes más frecuentes correspondieron a línea Africana (49%). En un estudio de los polimorfismos de la región codificante de E6 de VPH16 en muestras anales de una cohorte combinada de mujeres y hombres infectados o no por VIH-1 en San Francisco, no se observó asociación entre la presencia de variantes no Europeas de VPH16 y la infección por VIH-1 (Da Costa *et al.*, 2002).

Los datos de los estudios realizados en países europeos describen las variantes de la rama Europea como las más prevalentes tanto en pacientes infectados como no infectados por VIH-1. En un estudio realizado en Italia, los autores identificaron las variantes de VPH16, en 227 mujeres infectadas o no por VIH-1. Las variantes Europeas de la clase E-350G fueron las más prevalentes en las mujeres infectadas y no infectadas por VIH-1, con una frecuencia del 66,7% en las mujeres infectadas por VIH-1 y del 50% en las mujeres no infectadas por VIH-1. Los autores sólo detectaron variantes de la línea Africana tipo 2 en mujeres infectadas por VIH-1, por lo que sugieren ciertas diferencias en el comportamiento sexual entre las mujeres infectadas y no infectadas por VIH-1 (Tornesello *et al.*, 2008b).

En España el único trabajo llevado a cabo, se publicó en el año 2001 y los autores identificaron las variantes de la región codificante de E6 de VPH16 en mujeres infectadas o no por VIH-1 (Perez-Gallego *et al.*, 2001). Las variantes más prevalentes fueron las que pertenecían a la rama Europea, siendo del 89,9% para las mujeres no infectadas por VIH-1 y 92,3% para las mujeres infectadas por VIH-1. En nuestro trabajo, las variantes de VPH16 pertenecientes a la rama Europea han sido también las más prevalentes entre los pacientes infectados por VIH-1 (91,2%) y no infectados por VIH-1 (82,2%) y no se han establecido diferencias estadísticamente significativas en la distribución en ambos grupos de estudio en el análisis univariable de la infección con variantes Europeas frente a la infección con variantes no Europeas. La variante más prevalente de la rama Europea en ambos grupos de estudio, fue la variante representada por la secuencia SP4152 asignada a la clase E-350G, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en su distribución (38,2% y 28,9%;  $p = 0,38$ . Datos no mostrados). Al igual que en el estudio llevado a cabo en Italia (Tornesello *et al.*, 2008b) la mutación más frecuente se observó en la posición 350 de la región codificante de E6, y se identificó de manera homogénea entre los pacientes infectados por VIH-1 y en los no infectados por VIH-1 (2,8% *vs.* 37,2%;  $p = 0,25$ . Datos no mostrados). En las variantes de las líneas Asiático-Americana y Africana, se observó la mayor frecuencia entre los pacientes infectados por VIH-1, aunque no se describieron diferencias entre los grupos de estudio. La menor prevalencia entre las variantes de VPH16 de este trabajo, se detectó para la línea Africana tipo 2, y no se establecieron como en el caso de Italia, asociaciones entre los dos grupos de estudio para esta rama filogenética. En las variantes de VPH18, los trabajos llevados a cabo en pacientes infectados por VIH-1 son también muy escasos. Un trabajo realizado en Brasil, determina los polimorfismos de VPH18 en la región reguladora y en las regiones codificantes de E6 y

L1 en mujeres infectadas o no por VIH-1, aunque los autores no asocian la presencia de determinadas variantes pertenecientes a las diferentes ramas filogenéticas con el estatus VIH-1 (Cerqueira *et al.*, 2008). En el presente estudio, las variantes de VPH18 más prevalentes fueron las que se asignaron a la rama Europea y se distribuyeron homogéneamente entre los pacientes infectados o no por VIH-1, aunque en esta rama la variante representada por la secuencia SP6015 sólo se identificó en pacientes infectados por VIH-1. En el resto de tipos analizados en el presente estudio, no existen datos bibliográficos sobre la distribución de las variantes entre pacientes infectados o no por VIH-1. En este estudio, no se han detectado diferencias en la distribución de las variantes de VPH31, VPH33 y VPH52 entre los pacientes infectados o no por VIH-1, observándose una distribución homogénea de las variantes de los diferentes tipos estudiados, lo que puede sugerir que en la población estudiada no hay diferencias en el comportamiento sexual entre los pacientes infectados o no por VIH-1, aunque son necesarios más estudios con un mayor tamaño muestral.

#### **5.4. Influencia del origen geográfico de los pacientes en la distribución de variantes de tipos de VPH de alto riesgo**

De forma clásica, la distribución de variantes de VPH se ha asociado con el origen étnico de los pacientes, siendo una de las variables asociada a la posible evolución conjunta del VPH y su hospedador (Villa *et al.*, 2000; Giannoudis *et al.*, 2001; Aho *et al.*, 2003, 2004; Gagnon *et al.*, 2004; Tornesello *et al.*, 2004; Del refugio *et al.*, 2004; Pista *et al.*, 2007; Junes-Gill *et al.*, 2008; Pillai *et al.*, 2009). En el presente estudio, se analizó la distribución de las variantes de acuerdo al origen geográfico de los pacientes, teniendo en cuenta que la población de estudio se dividía fundamentalmente, en pacientes de origen español y latinoamericano. En las variantes de VPH16, los trabajos realizados en poblaciones en México (Berumen *et al.*, 2001; Calleja-Macías *et al.*, 2004; Del Refugio *et al.*, 2004) y Costa Rica (Hildesheim *et al.*, 2001), los datos publicados indican que las variantes Asiático-Americanas son las más frecuentes. Los resultados de dos estudios llevados en cabo en Brasil, describen valores de prevalencia muy similares en las variantes Asiático-Americanas (43-41%) y en las variantes Europeas (42-50%), aunque estas ligeras diferencias en poblaciones de Brasil, pueden ser atribuidas a la elevada mezcla poblacional originada por los cruces interétnicos (Cruz *et al.*, 2004; Junes-Gill *et al.*, 2008). En este trabajo los datos observados en ambos grupos de estudio incluyeron las variantes asignadas a la rama Europea como las más prevalentes, de la misma forma que se ha observado en otros países europeos como Portugal (Pista *et al.*, 2007) o Italia (Tornesello *et*



*al.*, 2008b) con muestras poblacionales que incluían pacientes de diferentes orígenes geográficos. En este estudio además, las variantes Asiático-Americanas y Africanas se distribuyeron de forma homogénea entre los pacientes tanto de origen español como latinoamericano, y entre los pacientes procedentes de países latinoamericanos los valores de prevalencia que mostraron las variantes Asiático-Americanas fueron bajos en comparación con los descritos en los trabajos llevados a cabo en países de Latinoamérica.

La bibliografía de variantes de VPH18 en países latinoamericanos incluye dos trabajos llevados a cabo en mujeres de Brasil (Villa *et al.*, 2000; Sichero *et al.*, 2007) y un estudio de mujeres mexicanas infectadas tanto por VPH16 como VPH18 (Lizano *et al.*, 2006). En los tres trabajos, las variantes que se detectaron con más frecuencia pertenecían a la línea Europea, lo que es similar a los resultados observados en el presente trabajo, en el que la mayor prevalencia descrita fue en las variantes asignadas a la rama Europea tanto en pacientes españoles como en pacientes latinoamericanos. Sin embargo observamos que ser un hombre latinoamericano, estaba asociado con una prevalencia entre siete y ocho veces mayor de estar infectado con una variante asignada a una rama no Europea, lo que podría deberse a diferencias genéticas características propias de la población latinoamericana, aunque serán necesarios más estudios para evaluar esta posibilidad.

En el análisis de polimorfismos llevado a cabo en VPH31, los autores refieren diferencias con respecto a la raza, y describen que en las mujeres caucásicas se observa con más frecuencia que están infectadas por la variante prototipo (Gagnon *et al.*, 2005). En nuestro trabajo, la variante prototipo se localizó en los hombres españoles (18,2%) y en los hombres latinoamericanos (16,7%), sin embargo fueron las variantes no prototipo las que se identificaron con más frecuencia, aunque no observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución. En VPH33, los autores de un estudio de los polimorfismos en las tres regiones del genoma estudiadas en nuestro trabajo (regiones codificantes E6 y E7, y región reguladora), no describen diferencias en la distribución de las variantes prototipo y no prototipo, en muestras obtenidas de mujeres procedentes de Canadá y Brasil (Khouadri *et al.*, 2006). En los pacientes de nuestro estudio tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variantes no prototipo ya que se identificaron en ambos grupos de pacientes, pero las variantes prototipo sólo se observaron en los pacientes españoles. En un estudio llevado a cabo en Canadá de las variantes de VPH52 en las tres regiones analizadas en nuestro trabajo, los autores describen la variante prototipo con más frecuencia en las mujeres de origen caucásico y las variantes no prototipo entre las mujeres descendientes de mujeres africana, tal y como se

ha descrito para el tipo viral 33. En las variantes detectadas en nuestro trabajo, en los hombres latinoamericanos las variantes se distribuyeron homogéneamente, y aunque en los hombres españoles se detectaron con mas frecuencia las variantes no prototipo (76,9%), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Estos resultados de distribución homogénea de las variantes de los diferentes tipos virales en pacientes procedentes de distintos países de origen, podrían ser consecuencia de que los pacientes llevan mucho tiempo en España y se han infectado con las variantes circulantes, que los comportamientos sexuales entre los pacientes son muy similares, o que las poblaciones no están aisladas. Sin embargo, debido a que los escasos datos bibliográficos asocian las diferencias en la distribución de las variantes al diferente origen étnico de los pacientes, no se pueden extraer conclusiones.

Una limitación importante del presente estudio para analizar el efecto de la infección por VIH-1 y el origen geográfico de los pacientes, en la distribución de las variantes de los genotipos de VPH de alto riesgo más relevantes en el cáncer anal, es el reducido tamaño muestral en cada uno de los tipos virales analizados, si bien es, hasta el momento, el primer estudio realizado en España sobre la caracterización de variantes de VPH en la infección anal de HSH infectados y no infectados por VIH. La ampliación del presente estudio requiere el análisis de cohortes multicéntricas de pacientes HSH infectados y no infectados por VIH-1. Así mismo, no se ha podido establecer correlaciones entre la presencia de determinadas variantes y las lesiones asociadas a la infección por VPH. Este hecho, se debe a que se carecía de los datos de citología anal de dichos pacientes. El cribado de lesiones preneoplásicas cervicales mediante citología y tinción de Papanicolaou es la intervención preventiva de cáncer que más éxito ha tenido en la historia de la Medicina, reduciendo en un 75% el cáncer de cérvix en los países desarrollados en los últimos 50 años. El cribado de cancer de ano se realiza mediante tacto rectal y se ha de realizar anualmente, aun en ausencia de otras técnicas de diagnóstico y tratamiento de AIN (Palefsky *et al.*, 2008). A pesar de haber demostrado ser coste-efectiva en HSH infectados por VIH-1 (Goldie *et al.*, 1999) al mismo nivel que otras intervenciones ampliamente aceptadas (cribado de cáncer de colon en población general, profilaxis de neumonía por *Pneumocystis*), la citología anal no se ha implementado de forma general y en el momento del estudio existían importantes limitaciones para su realización en este grupo de pacientes.







## 6. CONCLUSIONES

6.1. La prevalencia global de infección por VPH de alto riesgo obtenida en muestras anales procedentes de hombres que practican sexo con hombres (HSH) fue del 54,9%, siendo significativamente mayor en aquellos individuos infectados por VIH-1 (74,8 *vs.* 43,3%;  $p < 0,001$ ). Además, estar infectado por VIH-1 y proceder de un país latinoamericano se asocia con una probabilidad entre cuatro y cinco veces mayor (OR 4,6; IC95%:1,3-16,4) de presentar una infección anal por VPH de alto riesgo.

6.2. Los genotipos de VPH de alto riesgo más prevalentes fueron VPH16 (21,9%), seguido por VPH18 (12,1%) y VPH51 (10,6%). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de todos los genotipos de alto riesgo entre los pacientes infectados y no infectados por VIH-1 excepto en VPH35, VPH39 y VPH45. La prevalencia de infecciones por múltiples tipos de VPH de alto riesgo oncogénico fue del 34,9%, siendo significativamente mayor en los pacientes infectados por VIH-1 (24% *vs.* 55,2%  $p < 0,001$ ).

6.3. El análisis filogenético de las variantes en las tres regiones del genoma analizadas nos ha permitido establecer la ausencia de variantes recombinantes o infecciones por múltiples variantes en los tipos de VPH16, VPH31, VPH33 y VPH52 en las muestras analizadas. En VPH18 se identificaron tres variantes recombinantes o infecciones múltiples. Dos de ellas fueron variantes recombinantes de las ramas Europea y Asiático-Amerindia y la tercera de las ramas Europea y Africana.

6.4. El estudio de las variantes de VPH16 y VPH18 nos permitió establecer, que en la población estudiada, las variantes pertenecientes a la rama Europea son las mayoritarias. Las variantes no prototipo fueron las más frecuentemente detectadas en los tipos VPH31, VPH33 y VPH52.

6.5. En el presente estudio se han identificado 13 variantes no descritas previamente en la bibliografía, una de VPH16 (1,2%), seis de VPH18 (13%), una de VPH31 (3,4%), dos de VPH33 (9,1%) y tres variantes de VPH52 (13,6%).

6.6. Los estudios funcionales sobre las implicaciones de las mutaciones presentes en las diferentes variantes de VPH se han focalizado en VPH16. Algunos estudios han asociado

la presencia de la mutación en la posición 350(T→G) de la región codificante de la proteína viral E6, con la persistencia de la infección viral y el incremento del potencial oncogénico de estas variantes. En el presente trabajo, dicha mutación se ha detectado en el 55,4% de los pacientes infectados por VPH16. Los efectos a nivel biológico del resto de las mutaciones detectadas, tanto en las regiones codificantes como en la región reguladora, son desconocidos en la actualidad y deben ser objeto de futuras investigaciones.

6.7. La infección por VIH-1 no influye en la distribución de las variantes entre los pacientes. En las variantes de VPH16 y VPH18, las Europeas fueron las mayoritarias tanto en los pacientes infectados por VIH-1 como en los no infectados. De manera similar, en VPH31, VPH33 y VPH52 las variantes no prototipo fueron mayoritarias en los dos grupos de estudio.

6.8. El origen geográfico de los pacientes no influye en la distribución de las variantes en los genotipos VPH16, VPH31, VPH33 y VPH52. Sin embargo, en VPH18, se observó que los pacientes procedentes de países latinoamericanos presentaban más frecuentemente variantes clasificadas como no Europeas que los pacientes de origen español.







- **Abramowitz L., Benabderrahmane D., Baron G., Walker F., Yeni P., Duval X.** Systematic evaluation and description of anal pathology in HIV-infected patients during the HAART era. *Dis. Colon Rectum.* **2009**; 52: 1130-6.
- **Ahdieh L., Klein R.S., Burk R., Cu-Uvin S., Schuman P., Duerr A., Safaeian M., Astemborski J., Daniel R., Shah K.** Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J. Infect. Dis.* **2001**; 184: 682-90.
- **Aho J., Hankins C., Tremblay C., Forest P., Pourreaux K., Rouah F., Coutlée F.** Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. *J. Infect. Dis.* **2004**; 190: 46-52.
- **Aho J., Hankins C., Tremblay C., Lang F., Forest P., Pourreaux K., Rouah F., Coutlée F.** Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *J. Infect. Dis.* **2003**; 188: 1517-27.
- **Alencar T.R., Cerqueira D.M., Da Cruz M.R., Wyant P.S., Ramalho E.D., Martins C.R.** New HPV-16 European and non-European variants in Central Brazil. *Virus Genes.* **2007**; 35: 1-4.
- **Alvarez-Salas L.M., López-Bayghen E.** Genetic regulation of human genital papillomaviruses. *Salud Pública Mex.* **1995**; 37: 241-7.
- **An J., Mo D., Liu H., Veena M.S., Srivatsan E.S., Massoumi R., Rettig M.B.** Inactivation of the CYLD deubiquitinase by HPV E6 mediates hypoxia-induced NF-kappaB activation. *Cancer Cell* **2008**; 14: 394-407.
- **Anderson J., Hoy J., Hillman R., Gittleson C., Hartel G., Medley G., Bassar R.** Abnormal anal cytology in high-risk human papilloma virus infection in HIV-infected Australians. *Sex. Transm. Infect.* **2008**; 84: 94-6.
- **Apple R.J., Erlich H.A., Klitz W., Manos M.M., Becker T.M., Wheeler C.M.** HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature Genet.* **1994**; 6: 157-62.
- **Arias-Pulido H., Peyton C.L., Torrez-Martinez N., Anderson D.N., Wheeler C.M.** Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology* **2005**; 338: 22-34.
- **Austen M., Luscher B., Luscher-Firzlaff J.M.** Characterization of the transcriptional regulator YY1. The bipartite transactivation domain is independent of

interaction with the TATA box-binding protein, transcription factor IIB, TAFII55, or cAMP-responsive element-binding protein (CPB)-binding protein. *J. Biol. Chem.* **1997**; 272: 1709-17.

- **Bauknecht T., Shi Y.** Overexpression of C/EBPbeta represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein. *J. Virol.* **1998**; 72: 2113-24.
- **Bedard K.M., Underbrink M P., Howie H.L., Galloway D.A.** The E6 oncoproteins from human betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J. Virol.* **2008**; 82: 3894-902.
- **Bekkers R.L., Massuger L.F., Bulten J., Melchers W.J.** Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev. Med. Virol.* **2004**; 14: 95-105.
- **Benoist C., Chambon P.** In vivo sequence requirements of the SV40 early promotor region. *Nature* **1981**; 290: 304-10.
- **Berezutskaya E.B., Yu A., Morozov, Raychaudhuri P., Bagchi S.** Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ.* **1997**; 8: 1277-86.
- **Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z., Van Doorslaer K., Hausen H., De Villiers E.M.** Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **2010**; 401: 70-9.
- **Bernard H.U., Calleja-Macias I.E., Dunn T.** Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer* **2006**; 118: 1071-76.
- **Bernard, H.U.** Coevolution of papillomaviruses and human populations. *Trends Microbiol.* **1994**; 2: 140-43.
- **Berumen J., Ordonez R.M., Lazcano E., Salmeron J., Galvan S.C., Estrada R.A., Yunes E., Garcia-Carranca A., Gonzalez-Lira G., Madrigal-de la Campa A.** Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**; 93: 1325-30.
- **Beskow A.H., Engelmark M.T., Magnusson J.J., Gyllensten U.B.** Interaction of host and viral risk factors for development of cervical carcinoma in situ. *Int. J. Cancer* **2005**; 117: 690-2.

- **Bontkes H.J., Van Duin M., de Gruijl T.D., et al.** HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int. J. Cancer* **1998**; 78: 166-71.
- **Bosch F.X., Burchell A.N., Schiffman M., Giuliano A.R., De Sanjose S., Bruni L., Tortolero-Luna G., Kjaer S.K., Muñoz N.** Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* **2008**; 26: 1-16.
- **Bosch F.X., De Sanjose S.** Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2003**; 31: 3-13.
- **Bosch F.X., Manos M.M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A., Peto J., Schiffman M.H., Moreno V., Kurman R., Shah K.V.** Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **1995**; 87: 796-802.
- **Bousarghin L., Touze A., Sizaret P.Y., Coursaget P.** Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J. Virol.* **2003**; 77: 3846-50.
- **Boxman I.L., Hogewoning A., Mulder L.H., Bouwes Bavinck J.N., ter Schegget J.** Detection of human papillomavirus types 6 and 11 in pubic and perianal hair from patients with genital warts. *J. Clin. Microbiol.* **1999**; 37: 2270-3.
- **Boyer S.N., Wazer D.E., Band V.** E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* **1996**; 56: 4620-24.
- **Brady C.S., Duggan-Keen M.F., Davidson J.A., Varley J.M., Stern P.L.** Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J. Gen. Virol.* **1999**; 80: 3233-40.
- **Brown D.** HPV type 6/11/16/18 vaccine: first analysis of cross-protection against persistent infection, cervical intraepithelial neoplasia (CIN), and adenocarcinoma in situ (AIS) caused by oncogenic HPV types in addition to 16/18. 47<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, September 17-20 **2007**.
- **Brown D.R., Shew M.L., Qadadri B., Neptune N., Vargas M., Tu W.** A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J. Infect. Dis.* **2005**; 191: 182-92.
- **Burchell A.N., Winer R.L., De Sanjose S., Franco E.L.** Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* **2006**; 24: 52-61.
- **Burd E.M.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**; 16: 1-17.

- Burk R.D., Teraï M., Gravitt P.E., Brinton L.A., Kurman R.J., Barnes W.A., Greenberg M.D., Hadjimichael O.C., Fu L., McGowan L., Mortel R., Schwartz P.E., Hildesheim A. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res.* **2003**; 63: 7215-20.
- Calleja-Macias I.E., Kalantari M., Huh J., Ortiz-Lopez R., Rojas-Martinez A., Gonzalez-Guerrero J.F., Williamson A.L., Hagmar B., Wiley D.J., Villarreal L., Bernard H.U., Barrera-Saldaña H.A. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology* **2004**; 319: 315-23.
- Calleja-Macias I.E., Villa L.L., Prado J.C., Kalantari M., Allan B., Williamson A.L., Chung L.P., Collins R.J., Zuna R.E., Dunn S.T., Chu T.Y., Cubie H.A., Cuschieri K., von Knebel-Doeberitz M., Martins C.R., Sanchez G.I., Bosch F.X., Muñoz N., Bernard H.U. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **2005**; 79: 13630-40.
- Carter J.J., Madeleine M.M., Shera K., Schwartz S.M., Cushing-Haugen K.L., Wipf G.C., Porter P., Daling J.R., McDougall J.K., Galloway D.A. Human papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. *Cancer Res.* **2001**; 61: 1934-40.
- Castellsagué X., Bosch F.X., Muñoz N. Environmental cofactors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* **2002**; 89: 191-9.
- Castellsagué X., Diaz M., De Sanjose S., Munoz N., Herrero R., Franceschi S., Peeling R.W., Ashley R., Smith J.S., Snijders P.J., Meijer C.J., Bosch F.X. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**; 98: 303-15.
- Cento V., Ciccozzi M., Ronga L., Perno C.F., Ciotti M. Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 genes in Italian women with different grades of cervical lesions. *J. Med. Virol.* **2009**; 81: 1627-34.
- Cerqueira D.M., Raiol T., Vêras N.M., Von Gal Milanezi N., Amaral F.A., De Macedo Brígido M., Martins C.R. New variants of human papillomavirus type 18 identified in central Brazil. *Virus Genes* **2008**; 37: 282-7.

- **Chan P.K., Lam C.W., Cheung T.H., Li W.W., Lo K.W., Chan M.Y., Cheung J.L., Xu L.Y., Cheng A.F.** Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J. Infect. Dis.* **2002**; 186: 696-700.
- **Chan S.Y., Ho L., Ong C.K., Chow V., Drescher B., Durst M., Ter-Meulen J., Villa L., Luande J., Mgaya H.N., Bernard H.U.** Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J. Virol.* **1992**; 66: 2057-66.
- **Chaturvedi A.K., Brinkman J.A., Gaffga A.M., Dumestre J., Clark R.A., Braly P.S., Dunlap K., Kissinger P.J., Hagensee M.E.** Distribution of human papillomavirus type 16 variants in human immunodeficiency virus type 1-positive and -negative women. *J. Gen. Virol.* **2004**; 85: 1237-41.
- **Chen S., Tabrizi S.N., O'Sullivan H., Fairley C.K., Quinn M.A., Garland S.M.** Lack of association between HLA DQ B1 alleles with HPV infection and histological findings in cervical cancer in Australian women. *Int. J. Gynaecol. Pathol.* **1999**; 9: 220-24.
- **Chen Z., DeSalle R., Schiffman M., Herrero R., Burk R.D.** Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. *J. Virology* **2009**; 83: 1443-55.
- **Chen Z., Terai M., Fu L., Herrero R., De Salle R., Burk R.D.** Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J. Virol.* **2005**; 79: 7014-23.
- **Chin-Hong P.V., Berry J.M., Cheng S.C., Catania J.A., Da Costa M., Darragh T.M., Fishman F., Jay N., Pollack L.M., Palefsky J.M.** Comparison of patient- and clinician-collected anal cytology samples to screen for human papillomavirus-associated anal intraepithelial neoplasia in men who have sex with men. *Ann. Intern. Med.* **2008**; 149: 300-6.
- **Classon M., Dyson N.** p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res.* **2001**; 264: 135-47.
- **Clifford G., Smith J., Plummer M., Muñoz N., Franceschi S.** Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis, *Br. J. Cancer* **2003**; 88: 63-73.
- **Clifford G.M., Smith J.S., Aguado T., Franceschi S.** Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis, *Br. J. Cancer* **2003**; 89: 101-5.
- **Cobrinik D.** Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **2005**; 24: 2796-809.

- **Coggin J.R., Zur Hausen H.** Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res.* 1979; 39: 545-6.
- **Cole S.T., Streeck R.E.** Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer. *J. Virol.* 1986; 58: 991-5.
- **Combita A.L., Bravo M.M., Touzé A., Orozco O., Coursaget P.** Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 virus-like particles in colombian women with invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer* 2002; 97: 796-803.
- **Conger K.L., Liu J.S., Kuo S.R., Chow L.T., Wang T.S.** Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase  $\alpha$ /primase. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 2696-705.
- **Cooper B., Schneider S., Bohl J., Jiang Y.H., Beaudet A., Vande Pol S.** Requirement of E6AP and the features of human papillomavirusE6 necessary to support degradation of p53. *Virology* 2003; 306: 87-99.
- **Coursaget P.** Serology for human papillomavirus. *Salud Pública Mex.* 2003; 45: 61-6.
- **Coutlée F., Gravitt P., Kornegay J., Hankins C., Richardson H., Lapointe N., Voyer H., Franco E.** Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 902-7.
- **Coutlée F., Rouleau D., Petignat P., Ghattas G., Kornegay J.R., Schlag P., Boyle S., Hankins C., Vézina S., Côté P., Macleod J., Voyer H., Forest P., Walmsley S., Franco E.** Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMY primers and the Linear array HPV genotyping test. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 1998-2006.
- **Cripe T.P., Haugen T.H., Turk J.P., Tabatabai F., Schmid P.G., Durst M., Gissmann L., Roman A., Turek L.P.** Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 1987; 6: 3745-53.
- **Critchlow C.W., Hawes S.E., Kuypers J.M., Goldbaum G.M., Holmes K.K., Surawicz C.M., Kiviat N.B.** Effect of HIV infection on the natural history of anal human papillomavirus infection. *AIDS* 1998; 12: 1177-84.
- **Critchlow C.W., Surawicz C.M., Holmes K.K., Kuypers J., Daling J.R., Hawes S.E., Goldbaum G.M., Sayer J., Hurt C., Dunphy C., Kiviat, N.B.** Prospective study of high grade anal squamous intraepithelial neoplasia in a cohort of homosexual men:

influence of HIV infection, immunosuppression and human papillomavirus infection. *AIDS* 1995; 9: 1255-62.

- Cruz M.R., Cerqueira D.M., Cruz W.B., Camara G.N., Brígido M.M., Silva E.O., Carvalho L.G., Martins C.R. Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004; 99: 281-2.
- Cuzick J., Terry G., Monaghan J., Lopes A., Clarkson P., Duncan I. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1\* and DQB1\* alleles and cervical cancer in British women. *Br. J. Cancer* 2000; 82: 1348-52.
- Da Costa M.M., Hogeboom C.J., Holly E.A., Palefsky J.M. Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J. Infect. Dis.* 2002; 185: 1229-37.
- Dal Maso L., Franceschi S., Polesel J., Braga C., Piselli P., Crocetti E., Falcini F., Guzzinati S., Zanetti R., Vercelli M., Rezza G. Risk of cancer in persons with AIDS in Italy, 1985-1998. *Br. J. Cancer* 2003; 89: 94-100.
- Daling J.R., Madeleine M.M., Johnson L.G., Schwartz S.M., Shera K.A., Wurscher M.A., Carter J.J., Porter P.L., Galloway D.A., McDougall J.K. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer* 2004; 101: 270-80.
- Daling J.R., Madeleine M.M., Schwartz S.M., Shera K.A., Carter J.J., McKnight B., Porter P.L., Galloway D.A., McDougall J.K., Tamimi H. A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *Gynecol. Oncol.* 2002; 84: 263-70.
- Dames D.N., Ragin C., Griffith-Bowe A., Gomez P., Butler R. The prevalence of cervical cytology abnormalities and human papillomavirus in women infected with the human immunodeficiency virus. *Infect. Agent Cancer.* 2009; 4-S1/8: 1-6.
- Davy C.E., Jackson D.J., Wang Q., Raj K., Masterson P.J., Fenner N.F., Southern S., Cuthill S., Millar J.B., Doorbar J. Identification of a G2 arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 2002; 76: 9806-18.
- Day P.M., Lowy D.R., Schiller J.T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 2003; 307: 1-11.
- Day P.M., Roden R.B.S., Lowy D.R., Schiller J.T. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1 and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* 1998; 72: 142-50.
- De Boer M.A., Peters L.A., Aziz M.F., Siregar B., Cornain S., Vrede M.A., Jordanova E.S., Kolkman-Uljee S., Fleuren G.J. Human papillomavirus type 16 E6, E7,



and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol. Oncol.* 2004; 94: 488-94.

- De Boer M.A., Peters L.A., Aziz M.F., Siregar B., Cornain S., Vrede M.A., Jordanova E.S., Fleuren G.J. Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int. J. Cancer* 2005; 114: 422-5.
- De la Cruz-Hernández E., García-Carrancá A., Mohar-Betancourt A., Dueñas-González A., Contreras-Paredes A., Pérez-Cardenas E., Herrera-Goepfert R., Lizano-Soberón M. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 2459-68.
- De Pokomandy A., Rouleau D., Ghattas G., Vézina S., Côté P., Macleod J., Allaire G., Franco E.L., Coutlée F. Prevalence, clearance, and incidence of anal human papillomavirus infection in HIV-infected men: the HIPVIRG cohort study. *J. Infect. Dis.* 2009; 199: 965-73.
- De Roda Husman A.M., Walboomers J.M., Van Den Brule A.J. Meijer C.J., Snijders P.J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 1995; 76: 1057-62.
- De Sanjose S., Almirall R., Lloveras B., Font R., Diaz M., Muñoz N., Català I., Meijer C.J., Snijders P.J., Herrero R., Bosch F.X. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex. Transm. Dis.* 2003; 30: 788-93.
- De Sanjose S., Valls I., Paz C.M., Lloveras B., Quintana M.J., Shah K.V., Bosch F.X. Human papillomavirus and human immunodeficiency virus infections as risk factors for cervix cancer in women prisoners. *Med. Clin. (Barc.)* 2000; 115: 81-4.
- De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
- De Wilde J., De-Castro Arce J., Snijders P.J., Meijer C.J., Rösl F., Steenbergen R.D. Alterations in AP-1 and AP-1 regulatory genes during HPV-induced carcinogenesis. *Cell Oncol.* 2008; 30: 77-87.
- Deau M.C., Favre M., Orth G. Genetic heterogeneity among human papillomaviruses (HPV) associated with epidermodysplasia verruciformis: evidence for multiple allelic forms of HPV5 and HPV8 E6 genes. *Virology* 1991; 184: 492-503.
- Del Amo J., Gonzalez C., Losana J., Clavo P., Munoz L., Ballesteros J., García-Saiz A., Belza M.J., Ortiz M., Menéndez B., del Romero J., Bolumar F. Influence of age

and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. *Sex. Transm. Infect.* **2005**; 81: 79-84.

- **Del Refugio González-Losa M., Laviada Mier y Teran M.A., Puerto-Solís M., García-Carrancá A.** Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *J. Clin. Virol.* **2004**; 29: 95-8.
- **Delius H, Hofmann B.** Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1994**; 186: 13-31.
- **Dell G., Wilkinson K.W., Tranter R., Parish J., Leo Brady R., Gaston K.** Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J. Mol. Biol.* **2003**; 334: 979-91.
- **Desaintes C., Demeret C.** Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin. Cancer Biol.* **1996**; 7: 339-47.
- **Dimova D.K., Dyson N.J.** The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **2005**; 24: 2810-26.
- **Disbrow G.L., Hanover J.A., Schlegel R.** Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. *J. Virol.* **2005**; 79: 5839-46.
- **Dong X.P., Pfister H.** Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* **1999**; 80: 2097-101.
- **Dong X.P., Stubenrauch F., Beyer-Finkler E., Pfister H.** Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer* **1994**; 58: 803-8.
- **Doorbar J.** Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci. (Lond.)* **2006**; 110: 525-41.
- **Doorbar J., Ely S., Sterling J., McLean C., Crawford L.** Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **1991**; 352: 824-7.
- **Dunne E., Datta S., Markowitz L.** A Review of Prophylactic Human Papillomavirus Vaccines: Recommendations and Monitoring in the US. *Cancer Supplement.* **2008**; 113: 2995-3003.
- **Dunne E.F., Nielson C.M., Stone K.M., Markowitz L.E., Giuliano A.R.** Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J. Infect. Dis.* **2006**; 194: 1044-57.

- Ellis J.R.M., Keating P.J., Baird J., Hounsell E. F., Renouf D. V., Rowe M., Hopkins D., Duggan-Keen M.F., Bartholomew J.S., Young L.S., Stern.P.L. The association of an HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nature Med.* 1995; 1: 464-70.
- Eschle D., Dürst M., Ter Meulen J., Luande J., Eberhardt H.C., Pawlita M., Gissmann L. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 1829-32.
- Evander M., Frazer I.H., Payne E., Mei Qi Y., Hengst K., McMillan N. A. Identification of the  $\alpha 6$  integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* 1997; 71: 2449-56.
- Ferenczy A., Mitao M., Nagai N., Silverstein S.J., Crum C.P. Latent papillomavirus and recurring genital warts. *N. Engl. J. Med.* 1985; 313: 784-8.
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.
- Fife K.H., Wu J.W., Squires K.E., Watts D.H., Andersen J.W., Brown D.R. Prevalence and persistence of cervical human papillomavirus infection in HIV-positive women initiating highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2009; 51: 274-82.
- Finnen R.L., Erickson K.D., Chen X.S., Garcea R.L. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 2003; 77: 4818-26.
- Flores E.R., Lambert P.F. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J. Virol.* 1997; 71: 7167-79.
- Florin L., Schäfer F., Sotlar K., Streeck R.E., Sapp M. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein l2. *Virology* 2002; 295: 97-107.
- Forslund O., Antonsson A., Edlund K., Van Den Brule A.J., Hansson B.G., Meijer C.J., *et al.* Population-based type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in middle-aged Swedish women. *J. Med. Virol.* 2002; 66: 535-41.
- Foster S.A., Demers G.W., Etscheid B.G., Galloway D.A. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.* 1994; 68: 5698-705.

- **Franco E.L., Villa L.L, Sobrinho J.P., Prado J.M., Rousseau M.C., Désy M.** Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis.* **1999**; 180: 1415-23.
- **Frisch M., Biggar R.J., Engels E.A., Goedert J.J.** Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. AIDS-Cancer Match Registry Study Group. *JAMA* **2001**; 285: 1736-45.
- **Frisch M., Biggar R.J., Goedert J.J.** Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**; 92: 1500-10.
- **Fujinaga Y., Okazawa K., Nishikawa A., Yamakawa Y., Fukushima M., Kato I., Fujinaga K.** Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. *Virus Genes* **1994**; 9: 85-92.
- **Gagnon S., Hankins C., Money D., Pourreaux K., Franco E., Coutlée F.** Polymorphism of the L1 capsid gene and persistence of human papillomavirus type 52 infections in women at high risk or infected by HIV. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2007**; 44: 61-5.
- **Gagnon S., Hankins C., Tremblay C., Forest P., Pourreaux K., Coutlee F.** Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J. Infect. Dis.* **2004**; 190: 1575-85.
- **Gagnon S., Hankins C., Tremblay C., Pourreaux K., Forest P., Rouah F., Coutlée F.** Polymorphism of human papillomavirus type 31 isolates infecting the genital tract of HIV-seropositive and HIV-seronegative women at risk for HIV infection. *J. Med. Virol.* **2005**; 75: 213-21.
- **Garland S.M., Hernandez-Avila M., Wheeler C.M., Perez G., Harper D.M., Leodolter S., Tang G.W., Ferris D.G., Steben M., Bryan J., Taddeo F.J., Railkar R., Esser M.T., Sings H.L., Nelson M., Boslego J., Sattler C., Barr E., Koutsky L.A.** Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N. Engl. J. Med.* **2007**; 356: 1928-43.
- **Gewin L., Myers H., Kiyono T., Galloway D.A.** Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.* **2004**; 18: 2269-82.
- **Ghittoni R., Accardi R., Hasan U., Gheit T., Sylla B., Tommasino M.** The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* **2010**; 40: 1-13.

- **Giannoudis A., Herrington S.C.** Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J. Pathol.* **2001**; 193: 295-302.
- **Gilbert D.M., Cohen S.N.** Bovine papillomavirus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell* **1987**; 50: 59-68.
- **Giroglou T., Sapp M., Lane C., Fligge C., Christensen N.D., Streeck R.E., Rose R.C.** Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* **2001**; 19: 1783-93.
- **Giuliano A.R., Harris R., Sedjo R.L., Baldwin S., Roe D., Papenfuss M.R.** Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the Young Women's Health Study. *J. Infect. Dis.* **2002**; 186: 462-9.
- **Giuliano A.R., Nielson C.M., Flores R., Dunne E.F., Abrahamsen M., Papenfuss M.R., Markowitz L.E., Smith D., Harris R.B.** The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *J. Infect. Dis.* **2007**; 196: 1146-52.
- **Giuliano A.R., Tortolero-Luna G., Ferrer E., Burchell Ann N., De Sanjose S., Kruger S., Muñoz N., Schiffman M., Bosch F.X.** General Overview Epidemiology of Human Papillomavirus Infection in Men, Cancers other than Cervical and Benign Conditions. *Vaccine* **2008**; 26: 17-28.
- **Goedert J.J., Côté T.R., Virgo P., Scoppa S.M., Kingma D.W., Gail M.H., Jaffe E.S., Biggar R.J.** Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* **1998**; 351: 1833-9.
- **Goldie S.J., Kuntz K.M., Weinstein M.C., Freedberg K.A., Welton M.L., Palefsky J.M.** The clinical effectiveness and cost-effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions in homosexual and bisexual HIV-positive men. *JAMA* **1999**; 281: 1822-9.
- **Goldsborough M.D., DiSilvestre D., Temple G.F., Lorincz A.T.** Nucleotide sequence of human papillomavirus type 31: a cervical neoplasia-associated virus. *Virology* **1989**; 171: 306-11.
- **Gonzalez C., Canals J., Ortiz M., Munoz L., Torres M., Garcia-Saiz A., et al.** Prevalence and determinants of high-risk human papillomavirus (HPV) infection and cervical cytological abnormalities in imprisoned women. *Epidemiol. Infect.* **2008**; 136: 215-21.
- **Gonzalez C., Ortiz M., Canals J., Munoz L., Jarrin I., De la Hera M.G., García-Saiz A., del Amo J.** Higher prevalence of human papillomavirus infection in migrant women from Latin America in Spain. *Sex. Transm. Infect.* **2006**; 82: 260-2.

- **Gravitt P., Peyton C.L., Alessi T.Q., Wheeler C., Coutlée F., Hildesheim A., Schiffman M., Scott D.R., Apple R.J.** Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* **2000**; 38: 357-61.
- **Gregoire L., Cubilla A.L., Reuter V.E., Haas G.P., Lancaster W.D.** Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **1995**; 87: 1705-9.
- **Grulich A.E., Wan X., Law M.G., Coates M., Kaldor J.M.** Risk of cancer in people with AIDS. *AIDS* **1999**; 13: 839-43.
- **Han Y., Loo Y.M., Militello K.T., Melendy T.** Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *J. Virol.* **1999**; 73: 4899-907.
- **Harwood C.A., Proby C.M.** Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2002**; 15: 101-14.
- **Hazard K., Andersson K., Dillner J., Forslund O.** Human papillomavirus subtypes are not uncommon. *Virology* **2007**; 362: 6-9.
- **Heinemeyer T., Wingender E., Reuter I., Hermjakob H., Kel A.E., Kel O.V., Ignatieva E.V., Ananko E.A., Podkolodnaya O.A., Kolpakov F.A., Podkolodny N.L., Kolchanov N.A.** Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* **1998**; 26: 362-7.
- **Heinzel P.A., Chan S.Y., Ho L., O'Connor M., Balaram P., Campo M.S., Fujinaga K., Kiviat N., Kuypers J., Pfister H., Steinberg B.M., Tay S. K., Villa L.L., Bernard H.U.** Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J. Clin. Microbiol.* **1995**; 33: 1746-54.
- **Helt A.M., Galloway D.A.** Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* **2003**; 24: 159-69.
- **Herrero R., Hildesheim A., Bratti C., Sherman M.E., Hutchinson M., Morales J. Balmaceda I., Greenberg M.D., Alfaro M., Burk R.D., Wacholder S., Plummer M., Schiffman M.** Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J. Natl. Cancer. Inst.* **2000**; 92: 464-74.
- **Hessol N.A., Pipkin S., Schwarcz S., Cress R.D., Bacchetti P., Scheer S.** The impact of highly active antiretroviral therapy on non-AIDS-defining cancers among adults with AIDS. *Am. J. Epidemiol.* **2007**; 165: 1143-53.
- **Hessol N.A., Holly E.A., Efird J.T., Minkoff H., Schowalter K., Darragh T.M., Burk R.D., Strickler H.D., Greenblatt R.M., Palefsky J.M.** Anal intraepithelial neoplasia

in a multisite study of HIV-infected and high-risk HIV-uninfected women. *AIDS* 2009; 23: 59-70.

- **Hildesheim A., Han C.L., Brinton L.A., Kurman R.J., Schiller J.T.** Human papillomavirus type 16 and risk of preinvasive and invasive vulvar cancer: results from a seroepidemiological case-control study. *Obstet. Gynecol.* 1997; 90: 748-54.
- **Hildesheim A., Schiffman M.H., Bromley C., Wacholder S., Herrero R., Rodriguez A., Bratti M.C., Sherman M.E., Scarpidis U., Lin Q.Q., Terai M., Bromley R.L., Buetow K., Apple R.J., Burk R.D.** Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001; 93: 315-8.
- **Hildesheim A., Wang S.S.** Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res.* 2002; 89: 229-40.
- **Hildesheim A., Herrero R., Wacholder S., Rodriguez A.C., Solomon D., Bratti M.C., Schiller J.T., Gonzalez P., Dubin G., Porras C., Jimenez S.E., Lowy D.R.** Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomised trial. *JAMA* 2007; 298: 743-53.
- **Hiller T., Poppelreuther S., Stubenrauch F., Iftner T.** Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006; 15: 1262-7.
- **Hines C.S., Meghoo C., Shetty S., Biburger M., Brenowitz M., Hegde R.S.** DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus E2 proteins. *J. Mol. Biol.* 1998; 276: 809-18.
- **Ho G.Y., Bierman R., Beardsley L., Chang C.J., Burk R.D.** Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 423-8.
- **Ho L., Chan S.Y., Chow V., Chong T., Tay S.K., Villa L.L., Bernard H.U.** Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of phylogenetic tree. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 1765-72.
- **Ho L., Chan S.Y., Burk R.D., Das B.C., Fujinaga K., Icenogle J.P., Kahn T., Kiviat N., Lancaster W., Mavromara-Nazos P., Labropoulou V., Mitrani-Rosenbaum S., Norrild B., Radhakrishna M., Stoerker J., Syrjaenen K., Syrjaenen S., Tay S. K., Villa L.L., Wheeler C.M., Williamson A.L., Bernard H.U.** The genetic drift of human papillomavirus

type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J. Virol.* **1993**; 67: 6413-23.

- **Hoory T., Monie A., Gravitt P., Wu T.C.** Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus. *J. Formos. Med. Assoc.* **2008**; 107: 198-217.
- **Hoots B.E., Palefsky J.M., Pimenta J.M., Smith J.S.** Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int. J. Cancer* **2009**; 124: 2375-83.
- **Howie H.L., Katzenellenbogen R.A., Galloway D.A.** Papillomavirus E6 proteins. *Virology* **2009**; 384: 324-34.
- **Howley P. M.** Papillomaviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology*, 3ª edición. Editado por Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. Publicado por Lippincott-Raven Publishers. **1996**; volumen 2: 2045-76.
- **Hubbard R.A.** Human papillomavirus testing methods. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2003**; 127: 940-5.
- **Hubbert N.L., Sedman S.A., Schiller J.T.** Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol.* **1992**; 66: 6237-41.
- **Hubert W.G.** Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J. Virol.* **2005**; 79: 5914-22.
- **Huertas-Salgado A., Martín-Gómez D.C., Moreno P., Murillo R., Bravo M.M., Villa L., Molano M.** E6 molecular variants of human papillomavirus (HPV) type 16: An updated and unified criterion for clustering and nomenclature. *Virology* **2011**; 410: 201-15.
- **Hughes F.J., Romanos M.A.** E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* **1993**; 21: 5817-23.
- **Huibregtse J.M., Scheffner M., Howley P.M.** A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* **1991**; 10: 4129-35.
- **Huibregtse J.M., Scheffner M., Howley P.M.** Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell Biol.* **1993**; 13: 775-84.
- **Icenogle J.P., Laga M., Miller D., Manoka A.T., Tucker R.A., Reeves W.C.** Genotypes and sequence variants of human papillomavirus DNAs from human immunodeficiency virus type 1-infected women with cervical intraepithelial neoplasia. *J. Infect. Dis.* **1992**; 166: 1210-6.



- Iftner T., Villa L.L. Human papillomavirus technologies. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2003; 31: 80-8.
- Joyce J.G., Tung J.S., Przysiecki C.T., Cook J.C., Lehman E.D., Sands J.A., Jansen K.U., Keller P.M. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 5810-22.
- Junes-Gill K., Sichero L., Maciag P.C., Mello W., Noronha V., Villa L.L. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *J. Med. Virol.* 2008; 80: 1639-45.
- Kalantari M., Villa L.L., Calleja-Macias I.E., Bernard H.U. Human papillomavirus-16 and -18 in penile carcinomas: DNA methylation, chromosomal recombination and genomic variation. *Int. J. Cancer* 2008; 123: 1832-40.
- Kammer C., Warthorst U., Torrez-Martinez N., Wheeler C.M., Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J. Gen. Virol.* 2000; 81: 1975-81.
- Kammer C., Tommasino M., Syrjanen S., Delius H., Hebling U., Warthorst U., Pfister H., Zehbe I. Variants of the long control region and the E6 oncogene in European human papillomavirus type 16 isolates: implications for cervical disease. *Br. J. Cancer* 2002; 86: 269-73.
- Kang S., Jeon Y.T., Kim J.W., Park N.H., Song Y.S., Kang S.B., Lee H.P. Polymorphism in the E6 gene of human papillomavirus type 16 in the cervical tissues of Korean women. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2005; 15: 107-12.
- Karem K.L., Poon A.C., Bierl C., Nisenbaum R., Unger E. Optimization of a human papillomavirus-specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002; 9: 577-82.
- Kesis T.D., Slebos R.J., Nelson W.G., Kastan M.B., Plunkett B.S., Han S.M., Lorincz A.T., Hedrick L., Cho K.R. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 3988-92.
- Khouadri S., Villa L.L., Gagnon S., Koushik A., Richardson H., Ferreira S., Tellier P., Simao J., Matlashewski G., Roger M., Franco E.L., Coutlée F. Human papillomavirus type 33 polymorphisms and high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J. Infect. Dis.* 2006; 194: 886-94.

- Kim Y.B., Song Y.S., Jeon Y.T., Park J.S., Um S.J., Kim J.W., Park N.H., Kang S.B., Lee H.P. Sequence variation and the transcriptional activity of the upstream regulatory region in human papillomavirus 16 E7 variants in cervical cancer of Korean women. *Oncol. Rep.* **2005**; 14: 459-64.
- Kirnbauer R., Taub J., Greenstone H., Roden R., Dürst M., Gissmann L., Lowy DR., Schiller J.T. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* **1993**; 67: 6929-36.
- Kjaer S.K., Chackerian B., Van Den Brule A.J., Svare E.I., Paull G., Walbomers J.M. Schiller J.T., Bock J.E., Sherman M.E., Lowy D.R., Meijer C.L. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2001**; 10: 101-6.
- Kleter B., van Doorn L.J., ter Schegget J., Schrauwen L., van Krimpen K., Burger M., ter Harmsel B., Quint W. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive road-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am. J. Pathol.* **1998**; 153:1731-9.
- Klingelhutz A. J., Foster S.A., McDougall J.K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **1996**; 380: 79-82.
- Ko L., Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **1996**; 10: 1054-72.
- Koblin B.A., Hessol N.A., Zaubler A.G., Taylor P.E., Buchbinder S.P., Katz M.H., Stevens C.E. Increased incidence of cancer among homosexual men, New York City and San Francisco, 1978-1990. *Am. J. Epidemiol.* **1996**; 144: 916-23.
- Konya J., Dillner J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv. Cancer Res.* **2001**; 82: 205-28.
- Kreuter A., Brockmeyer N.H., Hochdorfer B., Weissenborn S.J., Stücker M., Swoboda J., Altmeyer P., Pfister H., Wieland U. Clinical spectrum and virologic characteristics of anal intraepithelial neoplasia in HIV infection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2005**; 52: 603-8.
- Krippner-Heidenreich A., Walsemann G., Beyrouthy M.J., Speckgens S., Kraft R., Thole H., Talanian R.V., Hurt M.M., Lüscher B. Caspase-dependent regulation and subcellular redistribution of the transcriptional modulator YY1 during apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **2005**; 25: 3704-14.
- Kurvinen K., Yliskoski M., Saarikoski S., Syrjänen K., Syrjänen S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur. J. Cancer* **2000**; 36:1402-10.

- **Lechner M.S., Laimins L.A.** Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* **1994**; 68: 4262-73.
- **Lee K., Magalhaes I., Clavel C., Briolat J., Birembaut P., Tommasino M., Zehbe I.** Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Res.* **2008**; 131:106-10.
- **Lenner P., Dillner J., Wiklund F., Hallmans G., Stendahl U.** Serum antibody responses against human papillomavirus in relation to tumour characteristics, response to treatment, and survival in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Immunol. Immunother.* **1995**; 40: 201-5.
- **Lichtig H., Algrisi M., Botzer L.E., Abadi T., Verbitzky Y., Jackman A., Tommasino M., Zehbe I., Sherman L.** HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology* **2006**; 350: 216-27.
- **Lie A.K., Skarsvag S., Haugen O.A., Skjeldestad F.E., Olsen A.O., Skovlund E., Rønningen K.S.** Association between the HLA DQB1\*0301 gene and human papillomavirus infection in high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynaecol. Pathol.* **1999**; 18: 206-10.
- **Liu J.P.** Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* **1999**; 13: 2091-104.
- **Lizano M., Berumen J., Guido M.C., Casas L., García-Carrancá A.** Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**; 89: 1227-31.
- **Lizano M., De la Cruz-Hernández E., Carrillo-García A., García-Carrancá A., Ponce de Leon-Rosales S., Dueñas-González A., Hernández-Hernández D.M., Mohar A.** Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecol. Oncol.* **2006**; 102: 230-5.
- **Londesborough P., Ho L., Terry G., Cuzick J., Wheeler C., Singer A.** Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int. J. Cancer* **1996**; 69: 364-8.
- **Longworth M.S., Laimins L.A.** Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004a**; 68: 362-72.
- **Longworth M.S., Laimins L.A.** The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **2004b**; 78: 3533-41.

- **Loo Y. M., Melendy T.** Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J. Virol.* **2004**; 78: 1605-15.
- **López-Saavedra A., González-Maya L., Ponce-de-León S., García-Carrancá A., Mohar A., Lizano M.** Functional implication of sequence variation in the long control region and E2 gene among human papillomavirus type 18 variants. *Arch. Virol.* **2009**; 154: 745-54.
- **Lorincz A.T., Lancaster W.D., Temple G.F.** Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.* **1986**; 58: 225-29.
- **Lorincz A.T., Quinn A.P., Lancaster W.D., Temple G.F.** A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* **1987**; 159: 187-90.
- **Manos M.M., Waldman J., Zhang T.Y., Greer C.E., Eichinger G., Schiffman M.H., Wheeler C.M.** Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses. *J Infect. Dis.* **1994**; 170: 1096-99.
- **Mantovani F., Banks L.** The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **2001**; 20: 7874-87.
- **Maran A., Amella C.A., Di Lorenzo T.P., Auburn K.J., Taichman L.B., Steinberg B.M.** Human papillomavirus type 11 transcripts are present at low abundance in latently infected respiratory tissues. *Virology* **1995**; 212: 285-94.
- **Masterson P.J., Stanley M.A., Lewis A.P., Romanos M. A.** A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase  $\alpha$ -primase p68 subunit. *J. Virol.* **1998**; 72: 7407-19.
- **Matos E., Loria D., Amestoy G.M., Herrera L., Prince M.A., Moreno J., Moreno J, Krunfly C., van den Brule A.J., Meijer C.J., Muñoz N., Herrero R.** Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: a population-based study. *Sex. Transm. Dis.* **2003**; 30: 593-9.
- **May M., Dong X.P., Stubenrauch F., Fuchs P.G. and Pfister H.** The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J.* **1994**; 13: 1460-66.
- **Mayrand M.H., Coutlée F., Hankins C., Lapointe N., Forest P., De Ladurantaye M., Roger M.** Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis. *J Clin. Microbiol.* **2000**; 38: 3388-93.

- **Mbulaiteye S.M., Parkin D.M., Rabkin C.S.** Epidemiology of AIDS related malignancies an international perspective. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2003**; 17: 673-96.
- **McMillan N.A., Payne E., Frazer I.H., Evander M.** Expression of the  $\alpha 6$  integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* **1999**; 261: 271-9.
- **McPhillips M.G., Ozato K., McBride A.A.** Interaction of bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 stabilizes its association with chromatin. *J. Virol.* **2005**; 79: 8920-32.
- **Melbye M., Cote T.R., Kessler L., Gail M., Biggar R.J.** High incidence of anal cancer among AIDS patients. The AIDS/Cancer Working Group. *Lancet* **1994a**; 343: 636-9.
- **Melbye M., Rahkin C., Frisch M., Biggar R.J.** Changing patterns of anal cancer incidence in the United States, 1940-1989. *Am. J. Epidemiol.* **1994b**; 139: 772-80.
- **Melbye M., Smith E., Wohlfahrt J., Osterlind A., Orholm M., Bergmann O.J., Mathiesen L., Darragh T.M., Palefsky J.M.** Anal and cervical abnormality in women-prediction by human papillomavirus tests. *Int. J. Cancer* **1996**; 68: 559-64.
- **Meyer T., Arndt R., Christophers E., Beckmann E.R., Schröder S., Gissmann L., Stockfleth E.** Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J. Infect. Dis.* **1998**; 178: 252-5.
- **Micali G., Nasca M.R., Innocenzi D., Schwartz R.A.** Penile cancer. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**; 54: 369-91.
- **Middleton K., Peh W., Southern S., Griffin H., Sotlar K., Nakahara T., El-Sherif A., Morris L., Seth R., Hibma M., Jenkins D., Lambert P., Coleman N., Doorbar J.** Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* **2003**; 77: 10186-201.
- **Miralles-Guri C., Bruni L., Cubilla A.L., Castellsagué X., Bosch F.X., de Sanjosé S** Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **2009**; 62: 870-8.
- **Moscicki A.B., Schiffman M., Kjaer S., Villa L.L.** Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* **2006**; 24: 42-51.
- **Muller E.E., Chirwa T.F., Lewis D.A.** Human papillomavirus (HPV) infection in heterosexual South African men attending sexual health services: associations between HPV and HIV serostatus. *Sex. Transm. Infect.* **2009**.
- **Munger K., Werness B.A., Dyson N., Phelps W.C., Harlow E., Howley P.M.** Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* **1989**; 8: 4099-105.

- **Muñoz N., Bosch F.X., Castellsagué X., Diaz M., de Sanjose S., Hammouda D., Shah K.V., Meijer C.J.** Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer* **2004a**; 111: 278-85.
- **Muñoz N., Méndez F., Posso H., Molano M., Van Den Brule A.J., Ronderos M., Meijer C., Muñoz A.** Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J. Infect. Dis.* **2004b**; 190(12): 2077-87.
- **Muñoz N., Castellsagué X., de González A.B., Gissmann L.** HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* **2006**; 24: 1-10.
- **Nakagoshi H., Nagase T., Kanei-Ishii C., Ueno Y., Ishii S.** Binding of the c-myc proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription. *J Biol Chem.* **1990**; 265: 3479-83.
- **Narechania A., Chen Z., DeSalle R., Burk R.D.** Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human papillomaviruses. *J. Virol.* **2005**; 79: 15503-10.
- **Nelson L.M., Rose R.C., Moroianu J.** Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J. Biol. Chem.* **2002**; 277: 23958-64.
- **Nielson C.M., Flores R., Harris R.B., Abrahamsen M., Papenfuss M.R., Dunne E.F. Markowitz L.E., Giuliano A.R.** Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**; 16: 1107-14.
- **Nindl I., Rindeisch K., Lotz B., Schneider A., Dürst M.** Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int. J. Cancer* **1999**; 82: 203-7.
- **Nindl I., Zumbach K., Pawlita M., Teller K., Schneider A., Dürst M.** Absence of antibody against human papillomavirus type 16 E6 and E7 in patients with cervical cancer is independent of sequence variations *J. Infect. Dis.* **2000**; 181: 1764-7.
- **O'Connor M., Chan S., Bernard H.U.** Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. *Human Papillomaviruses Compendium*. Editado por Myers, G., Bernard, H.U., Delius, H., Baker, K., Icenogle, J., Halpern, A., Wheeler, C. **1995**; parte III: 21-40.
- **Ong C.K., Chan S.Y., Campo M.S., Fujinaga K., Mavromara-Nazos P., Labropoulou V., Pfister H, Tay S.K., Meulen J.T., Villa L.L., Bernard H.U.** Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J. Virol.* **1993**; 67: 6424-31.

- **Orth G., Favre M., Croissant O.** Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J. Virol.* **1977**; 24: 108-20.
- **Ortiz M., Torres M., Muñoz L., Fernández-García E., Canals J., Cabornero A.I., Aguilar E., Ballesteros J., Del Amo J., García-Sáiz A.** Oncogenic human papillomavirus (HPV) type distribution and HPV type 16 E6 variants in two Spanish population groups with different levels of HPV infection risk. *J. Clin. Microbiol.* **2006**; 44: 1428-34.
- **Ortiz M., Torres M., González C., Hernández-Novoa B., Viciano P., Ballesteros J., Blanco J.R., Peña A., Del Romero J., Del Amo J.** High-Risk HPV Prevalence by HIV-1 Status in Spanish Men Who Had Sex with Men (MSM) in an Out Patient Sexually Transmitted Diseases Clinic and in a prospective cohort of HIV-positive MSM and women belonging to Spanish Multicenter Cohort (CoRIS). 17<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, February 16-19 **2010**.
- **Paavonen J., Jenkins D., Bosch F.X., Naud P., Salmerón J., Wheeler C.M., Chow S.N., Apter D.L., Kitchener H.C., Castellsague X., de Carvalho N.S., Skinner R., Harper D.M, Hedrick J.A., Jaisamrarn U., Limson G.M, Dionne M., Quint W., Spiessens B., Peeters P., Struyf F., Wieting S.L., Lehtinen M.O., Dubin G.** Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III doubleblind, randomised controlled trial. *Lancet* **2007**; 369: 2161-70.
- **Page R.D.** TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **1996**; 12: 357-8.
- **Palefsky J.M., Shiboski. S., Moss. A.** Risk factors for anal human papillomavirus infection and anal cytologic abnormalities in HIV-positive and HIV-negative homosexual men. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **1994**; 7: 599-606.
- **Palefsky J.M., Holly E.A., Ralston M.L., Arthur S.P., Jay N., Berry J.M., DaCosta M.M., Botts R., Darragh T.M.** Anal squamous intraepithelial lesions in HIV-positive and HIV-negative homosexual and bisexual men: prevalence and risk factors. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **1998a**, 17: 320-6.
- **Palefsky J.M., Holly E.A., Ralston M.L., Jay N.** Prevalence and risk factors for human papillomavirus infection of the anal canal in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative homosexual men. *J. Infect. Dis.* **1998b**; 177: 361-7.
- **Palefsky J.M., Holly E.A., Ralston M.L., Jay N., Berry J.M., Darragh T.M.** High incidence of anal high-grade squamous intraepithelial lesions among HIV-positive and HIV-negative homosexual/bisexual men. *AIDS* **1998c**, 12: 495-503.

- **Palefsky J.M., Holly E.A., Ralston M.L., Da Costa M., Greenblatt R.M.** Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J. Infect. Dis.* **2001**, 183: 383-91.
- **Palefsky J.M., Holly E.A.** Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2003**; 31: 41-6.
- **Palefsky J.M., Holly E.A., Efirdc J.T., Da Costa M., Jay N., Berry J.M., Darragh T.M.** Anal intraepithelial neoplasia in the highly active antiretroviral therapy era among HIV-positive men who have sex with men. *AIDS* **2005**; 19: 1407-14.
- **Palefsky J.M.** Human papillomavirus infection in HIV-infected persons. *Top. HIV Med.* **2007**; 15: 130-3.
- **Palefsky J.M.** Human papillomavirus and anal neoplasia. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **2008**; 5: 78-85.
- **Palefsky J.M.** Human papillomavirus-related disease in people with HIV. *Current. Opinion in HIV and AIDS* **2009**, 4: 52-6.
- **Palker T.J., Monteiro J.M., Martin M.M., Kakareka C., Smith J.F., Cook J.C., Joyce J.G., Jansen K.U.** Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with papillomavirus-like particles. *Vaccine* **2001**; 19: 3733-43.
- **Park J.S., Hwang E.S., Lee C.J., Kim C.J., Rha J.G., Kim S.J., Namkoong S.E., Um S.J.** Mutational and functional analysis of HPV-16 URR derived from Korean cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* **1999**; 74: 23-9.
- **Park T.C., Kim C.J., Koh Y.M., Lee K.H., Yoon J.H., Kim J.H., Namkoong SE, Park JS.** Human papillomavirus genotyping by the DNA chip in the cervical neoplasia. *DNA Cell Biol.* **2004**; 23: 119-25.
- **Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **2005**; 55: 74-108.
- **Parkin D.M.** The global health burden of infection associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* **2006a**, 118: 3030-44.
- **Parkin D.M., Bray F.** The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* **2006b**; 24: 11-25.
- **Patel H.S., Silver A.R., Northover J.M.** Anal cancer in renal transplant patients. *Int J Colorectal Dis.* **2005**, 22: 1-5.
- **Patterson N.A., Smith J.L., Ozbun M.A.** Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J. Virol.* **2005**; 79: 6838-47.



- **Pérez-Gallego L., Moreno-Bueno G., Sarrió D., Suárez A., Gamallo C., Palacios J.** Human papillomavirus-16 E6 variants in cervical squamous intraepithelial lesions from HIV-negative and HIV-positive women. *Am. J. Clin. Pathol.* **2001**; 116: 143-8.
- **Persson, G., Andersson, K., Krantz, I.** Symptomatic genital papillomavirus infection in a community. Incidence and clinical picture. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **1996**; 75: 287-90.
- **Pfister H.** Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2003**; 31: 52-6.
- **Pfister, H.** Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin. Cancer Biol.* **1992**, 3: 263-71.
- **Picconi M.A., Alonio L.V., Sichero L., Mbayed V., Villa L.L., Gronda J., Campos R., Teyssié A.** Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aborigines from Argentina. *J. Med. Virol.* **2003**; 69: 546-52.
- **Pierangeli A., Scagnolari C., Degener A.M., Bucci M., Ciardi A., Riva E., Indinnimeo M., Mancini G., D'Ettorre G., Vullo V., Antonelli G.** Type-specific human papillomavirus-DNA load in anal infection in HIV-positive men. *AIDS* **2008**; 22: 1929-35.
- **Piketty C., Darragh T.M., Da Costa M., Bruneval P., Heard I., Kazatchkine M.D., Palefsky J.M.** High prevalence of anal human papillomavirus infection and anal cancer precursors among HIV-infected persons in the absence of anal intercourse. *Ann. Intern. Med.* **2003**; 138: 453-9.
- **Pillai M.R., Sreevidya S., Pollock B.H., Jayaprakash P.G., Herman B.** Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* **2002**; 87: 268-73.
- **Pillai M.R., Hariharan R., Babu J.M., Lakshmi S., Chiplunkar S.V., Patkar M., Tongaonkar H., Dinshaw K., Jayashree R.S., Reddy B.K., Siddiqui M., Roychoudury S., Saha B., Abraham P., Gnanamony M., Peedicayil A., Subhashini J., Ram T.S., Dey B., Sharma C., Jain S.K., Singh N.** Molecular variants of HPV-16 associated with cervical cancer in Indian population. *Int. J. Cancer* **2009**; 125: 91-103.
- **Pista A., Oliveira A., Barateiro A., Costa H., Verdasca N., Paixão M.T.** Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 and risk for cervical neoplasia in Portugal. *J. Med. Virol.* **2007**; 79: 1889-97.
- **Prado J.C., Calleja-Macias I.E., Bernard H.U., Kalantari M., Macay S.A., Allan B., Williamson A.L., Chung L.P., Collins R.J., Zuna R.E., Dunn S.T., Ortiz-Lopez R., Barrera-Saldaña H.A., Cubie H.A., Cuschieri K., von Knebel-Doeberitz M., Sanchez**

**G.I., Bosch F.X., Villa L.L.** Worldwide genomic diversity of the human papillomaviruses-53, 56, and 66, a group of high risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology* **2005**; 340: 95-104.

▪ **Prusty B.K., Das B.C.** Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int. J. Cancer* **2005**; 113: 951-60.

▪ **Puig F., Echavarren V., Yago T., Crespo R., Montañés P., Palacios M., Lanzón R.** Prevalence of human papillomavirus in a random simple of an urban population in the city of Zaragoza (Spain). *Prog. Obst. Ginecol.* **2005**; 48: 172-8.

▪ **Rabkin C.S., Yellin F.** Cancer incidence in a population with a high prevalence of infection with human immunodeficiency virus type 1. *J. Natl. Cancer Inst.* **1994**; 86: 1711-16.

▪ **Raiol T., Wyant P.S., De Amorim R.M., Cerqueira D.M., Milanezi N.G., Brígido Mde M, Sichero L., Martins C.R.** Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. *J. Med. Virol.* **2009**; 81: 685-92.

▪ **Rajeevan M.S., Swan D.C., Nisenbaum R., Lee D.R., Vernon S.D., Ruffin M.T., Horowitz I.R., Flowers L.C., Kmak D., Tadros T., Birdsong G., Husain M., Srivastava S., Unger E.R.** Epidemiologic and viral factors associated with cervical neoplasia in HPV-16 positive women. *Int. J. Cancer* **2005**; 115: 114-20.

▪ **Rodriguez M.I., Finbow M.E., Alonso A.** Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* **2000**; 19: 3727-32.

▪ **Roka S., Rasoul-Rockenschaub S., Roka J., Kirnbauer R., Mühlbacher F., Salat A.** Prevalence of anal HPV infection in solid-organ transplant patients prior to immunosuppression. *Transpl. Int.* **2004**; 17: 366-9.

▪ **Romanczuk H., Thierry F., Howley P.M.** Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.* **1990**; 64(6): 2849-59.

▪ **Rose B., Steger G., Dong X.P., Thompson C., Cossart Y., Tattersall M., Pfister H.** Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J. Gen. Virol.* **1998**; 79: 1659-63.

- Rosenthal A.N., Ryan A., Al-Jehani R.M., Storey A., Harwood C.A., Jacobs I.J. P53 codón 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet* **1998**; 352: 871-2.
- Safaeian M., Van Doorslaer K., Schiffman M., Chen Z., Rodriguez A.C., Herrero R., Hildesheim A., Burk RD. Lack of heterogeneity of HPV16 E7 sequence compared with HPV31 and HPV73 may be related to its unique carcinogenic properties. *Arch. Virol.* **2010**; 155: 367-70.
- Salmeron J., Lazcano-Ponce E., Lorincz A. Hernández M., Hernández P., Leyva A., Uribe M., Manzanares H., Antunez A., Carmona E., Ronnett B.M., Sherman M.E., Bishai D., Ferris D., Flores Y., Yunes E., Shah K.V. Comparison of HPV-based assays with Papanicolaou smears for cervical cancer screening in Morelos State, Mexico. *Cancer Causes Control* **2003**; 14: 505-12.
- Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Biosci. Rep.* **1981**; 1: 3-18.
- Sankaranarayanan R., Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2006**; 20: 207-25.
- Schiffman M.H., Bauer H.M., Lorincz A.T., *et al.* Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *J. Clin. Microbiol.* **1991**; 29: 573-77.
- Schiffman M.H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **1992**; 84: 394-8.
- Schlecht N.F., Kulaga S., Robitaille J., Ferreira S., Santos M., Miyamura R.A., Duarte-Franco E., Rohan T.E., Ferenczy A., Villa L.L., Franco E.L.. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *J. Am. Med. Assoc.* **2001**; 286: 3106-14.
- Schlecht N.F., Burk R.D., Palefsky J.M, Minkoff H., Xue X., Massad L.S., Bacon M., Levine A.M., Anastos K., Gange S.J., Watts D.H., Da Costa M.M., Chen Z., Bang J.Y., Fazzari M., Hall C., Strickler H.D. Variants of human papillomaviruses 16 and 18 and their natural history in human immunodeficiency virus-positive women. *J. Gen. Virol.* **2005**; 86: 2709-20.
- Schwartz, S. Regulation of human papillomavirus late gene expression. *Ups. J. Med. Sci.* **2000**; 105: 171-92.
- Seedorf K., Krammer G., Durst M., Suhai S., Rowekamp W.G. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* **1985**; 145: 181-5.

- **Sehr P., Muller M., Hopfl R., Widschwendter A., Pawlita M.** HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase. *J. Virol. Methods* **2002**; 106: 61-70.
- **Seif I., Khoury G., Dhar R.** The genome of human papovavirus BKV. *Cell* **1979**; 18: 963-77.
- **Sekaric P., Cherry J.J., Androphy E.J.,** Binding of human papillomavirus type 16 E6 to E6AP is not required for activation of hTERT. *J. Virol.* **2008**; 82: 71-6.
- **Shafiti-Keramat S., Handisurya A., Kriehuber E., Meneguzzi G., Slupetzky K., Kirnbauer R.** Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J. Virol.* **2003**; 77: 13125-35.
- **Shamanin V., Glover M., Rausch C., Proby C., Leigh I.M., zur Hausen H., de Villiers E.M.** Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res.* **1994**; 54: 4610-13.
- **Shi Y., Lee J.S., Galvin K.M.** Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochem. Biophys. Acta* **1997**; 1332: 49-66
- **Shimoda K., Lorincz A.T., Temple G.F., Lancaster W. D..** Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* **1988**; 69: 2925-28.
- **Sichero L., Franco E.L., Villa L.L.** Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J. Infect. Dis.* **2005**; 191: 739-42.
- **Sichero L., Ferreira S., Trottier H., Duarte-Franco E., Ferenczy A., Franco E.L., Villa L.L.** high grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int. J. Cancer.* **2007**; 120: 1763-8.
- **Sirera G., Videla S., Piño M., Cañadas M.P., Llatjos M., Ballesteros A.L., Garcia-Cuyas F., Castella E., Guerola R., Tural C., Rey-Joly C., Clotet B.** High prevalence of human papillomavirus infection in the anus, penis and mouth in HIV-positive men. *AIDS* **2006**; 20: 1201-4.
- **Smith J.S., Lindsay L., Hoots B., Keys J., Franceschi S., Winer R., Clifford G.M.** Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int. J. Cancer.* **2007**; 121: 621-32.
- **Snowwhite I.V., Jones W.E., Dumestre J., Dunlap K., Braly P.S., Hagensee M.E.** Comparative analysis of methods for collection and measurement of cytokines and immunoglobulins in cervical and vaginal secretions of HIV and HPV infected women. *J. Immunol. Methods.* **2002**; 263: 85-95.

- **Song Y.S., Kee S.H., Kim J.W., Park N.H., Chang W.H., Lee H.P.** Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol. Oncol.* **1997**; 66: 275-81.
- **Southern E.M.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **1975**; 98: 503-17.
- **Stanley M.** Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* **2006**; 24: 16-22.
- **Steger G., Corbach S.** Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* **1997**; 71: 50-8.
- **Stewart A.C., Eriksson A.M., Manos M.M., Muñoz N., Bosch F.X., Peto J., Wheeler C.M.** Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J. Virol.* **1996**; 70: 3127-36.
- **Stewart D., Kazemi S., Li S., Massimi P., Banks L., Koromilas A.E., Matlashewski G.** Ubiquitination and proteasome degradation of the E6 proteins of human papillomavirus types 11 and 18. *J. Gen. Virol.* **2004**; 85: 1419-26.
- **Stöppler M.C., Ching K., Stoëppler H., Clancy K., Schlegel R., Icenogle J.** Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J. Virol.* **1996**; 70: 6987-93.
- **Storey A., Thomas M., Kalita A., Harwood C., Gardiol D., Mantovani F., Breuer J., Leigh I.M., Matlashewski G., Banks L.** Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer. *Nature* **1998**; 393: 229-34.
- **Straight S. W., Herman B. and McCance, D. J.** The E5 oncoprotein of HPV16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* **1995**; 69: 3185-92.
- **Strickler H.D., Schiffman M.H., Shah K.V., Rabkin C.S., Schiller J.T., Wacholder S., Clayman B., Viscidi R.P.** A survey of human papillomavirus 16 antibodies in patients with epithelial cancers. *Eur. J. Cancer Prev.* **1998**; 7: 305-13.
- **Sun X.W., Kuhn L., Ellerbrock T.V., Chiasson M.A., Bush T.J., Wright T.C., Jr.** Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.* **1997**; 337: 1343-49.
- **Tanzi E., Amendola A., Bianchi S., Fasolo M.M., Beretta R., Pariani E., Zappa A., Frati E., Orlando G.** Human papillomavirus genotypes and phylogenetic analysis of HPV-16 variants in HIV-1 infected subjects in Italy. *Vaccine* **2009**; 27: 17-23.
- **The FUTURE II Study Group.** Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N. Engl. J. Med.* **2007**; 356: 1915-27.

- **Thomas J.O., Herrero R., Omigbodun A.A., Ojemakinde K., Ajayi I.O., Fawole A., et al.** Prevalence of papillomavirus infection in women in Ibadan, Nigeria: a population-based study. *Br. J. Cancer* **2004**; 90: 638-45.
- **Thomas M., Kalita A., Labresque S., Pim D., Banks L., Matlashewski G.** Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell Biol.* **1999**; 19: 1092-100.
- **Thomas M.J., Seto E.** Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* **1999**; 236: 197-208.
- **Thompson D.A., Belinsky G., Chang T.H., Jones D.L., Schlegel R., Munger K.** The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene* **1997**; 15: 3025-35.
- **Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**; 22: 4673-80.
- **Tornesello M.L., Buonaguro F.M., Buonaguro L., Salatiello I., Beth-Giraldo E., Giraldo G.** Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *J. Gen. Virol.* **2000**; 81: 2969-82.
- **Tornesello M.L., Duraturo M.L., Salatiello I., Buonaguro L., Losito S., Botti G., Stellato G., Gregg S., Piccoli R., Pilotti S., Stefanon B., De Palo G., Franceschi S., Buonaguro F.M.** Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *J. Med. Virol.* **2004**; 74: 117-26.
- **Tornesello M.L., Duraturo M.L., Losito S., Botti G., Pilotti S., Stefanon B., De Palo G., Gallo A., Buonaguro L., Buonaguro F.M.** Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int. J. Cancer* **2008a**; 122: 132-7.
- **Tornesello M.L., Duraturo M.L., Giorgi-Rossi P., Sansone M., Piccoli R., Buonaguro L., Buonaguro F.M.** Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants in human immunodeficiency virus-positive Italian women. *J. Gen. Virol.* **2008b**; 89: 1380-9.
- **Touze A., de Sanjose S., Coursaget P., Almirall M.R., Palacio V., Meijer C.J., Kornegay J., Bosch F.X.** Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31, and 58 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes. *J. Clin. Microbiol.* **2001**; 39: 4344-48.

- **Trottier H., Franco E.L.** The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* **2006**; 24: 1-15.
- **Tungteakkhun S.S., Filippova M., Neidigh J.W., Fodor N., Duerksen-Hughes P.J.** The interaction between human papillomavirus type 16 and FADD is mediated by a novel E6 binding domain. *J. Virol.* **2008**; 82: 9600.
- **Van de Peer Y., De Wachter R.** TREECON: A software Packaged for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comp. Appl. Biosci.* **1993**, 9: 177-82.
- **Van den Brule A., Meijer C., Bakels V., Kenemans P., Walboomers J.** Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **1990**; 28: 2739-43.
- **Van Duin M., Snijders P.J., Vossen M.T., Klaassen E., Voorhorst F., Verheijen R.H., Helmerhorst T.J., Meijer C.J., Walboomers J.M.** Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codón 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J. Gen. Virol.* **2000**; 81: 317-25.
- **Velázquez A.T., Gariglio P.V.** Posible papel del factor de transcripción AP1 en la regulación tejido-específica del Papilomavirus humano. *Revista de Investigación clínica.* **2002**; 54: 231-42.
- **Veldman T., Liu X., Yuan H., Schlegel R.** Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**; 100: 8211.
- **Veress G., Murvai M., Szarka K., Juhász A., Kónya J., Gergely L.** Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur. J. Cancer* **2001**; 37: 1946-52.
- **Veress G., Szarka K., Dong X.P., Gergely L., Pfister H.** Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* **1999**; 80: 1035-43.
- **Videla S., Darwich L., Cañadas M.P., Paredes R., Tarrats A., Castella E., Llatjos M., Bofill M., Clotet B., Sirera G.** HIV-HPV Study Group Epidemiological data of different human papillomavirus genotypes in cervical specimens of HIV-1-infected women without history of cervical pathology. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2009**; 50: 168-75.
- **Villa L.L., Sichero L., Rahal P., Caballero O., Ferenczy A., Rohan T., Franco E.L.** Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* **2000**; 81: 2959-68.

- **Vogelstein B., Gillespie D.** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**; 76: 615-9.
- **Vos R.M., Altreuter J., White E.A., Howley P.M.** The ubiquitin specific peptidase USP15 regulates human papillomavirus type 16 E6 protein stability. *J. Virol.* **2009**; 83: 8885.
- **Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., Snijders P.J., Peto J., Meijer C.J., Muñoz N.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J. Pathol.* **1999**; 189: 12-19
- **Wheeler C.M., Yamada T., Hildesheim A., Jenison S.A.** Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* **1997**; 35: 11-19.
- **Winer R.L., Hughes J.P., Feng Q., O'Reilly S., Kiviat N.B., Holmes K.K., Koutsky L.A.** Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.* **2006**; 354: 2645-54.
- **Xi L.F., Carter J.J., Galloway D.A., Kuypers J., Hughes J.P., Lee S.K., Adam D.E., Kiviat N.B., Koutsky L.A.** Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2002**; 11: 343-51.
- **Xi L.F., Critchlow C.W., Wheeler C.M., Koutsky L.A., Galloway D.A., Kuypers J., Hughes J.P., Hawes S.E., Surawicz C., Goldbaum G., Holmes K.K., Kiviat N.B.** Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res.* **1998**; 58: 3839-44.
- **Xi L.F., Demers G.W., Koutsky L.A., Kiviat NB, Kuypers J., Watts D.H., Holmes K.K., Galloway D.A.** Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. *J. Infect. Dis.* **1995**; 172: 747-55.
- **Xi L.F., Demers W., Kiviat N.B., Kuypers J., Beckmann A.M., Galloway D.A.** Sequence variation in the noncoding region of human papillomavirus type 16 detected by single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Infect. Dis.* **1993**; 168: 610-7.
- **Xi L.F., Kiviat N.B., Hildesheim A., Galloway D.A., Wheeler C.M., Ho J., Koutsky L.A.** Human papillomavirus type 16 and 18 variants: racial-related distribution and persistence. *J Natl. Cancer Inst.* **2006**; 98: 1045-52.
- **Xi L.F., Koutsky L.A., Galloway D.A., Galloway D.A., Wheeler C.M., Ho J., Koutsky L.A.** Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **1997**; 89: 796-802.



- Xin C.Y., Matsumoto K., Yoshikawa H., Yasugi T., Onda T., Nakagawa S., Yamada M., Nozawa S., Sekiya S., Hirai Y., Shiromizu K., Fujii T., Taketani Y. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett.* **2001**; 170: 19-24.
- Yamada T., Wheeler C.M., Halpern A.L., Stewart A.C.M., Hildesheim A., Jenison S.A. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J. Virol.* **1995**; 69: 7743-53.
- Yamada T., Manos M.M., Peto J., Greer C.E., Munoz N., Bosch F.X., Wheeler C.M. Human papillomavirus type 16 sequence variations in cervical cancers: a worldwide perspective. *J. Virol.* **1997**; 71: 2463-72.
- You J., Croyle J.L., Nishimura A., Ozato K., Howley P.M. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tether the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **2004**; 117: 349-60.
- Zehbe I., Voglino G., Delius H., Wilander E., Tommasino M. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet* **1998a**; 352: 1441-2.
- Zehbe I., Wilander E., Delius H., Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* **1998b**; 58: 829-33.
- Zehbe I., Tachezy R., Mytilineos J., Voglino G., Mikyskova I., Delius H., Marongiu A., Gissmann L., Wilander E., Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int. J. Cancer* **2001**; 94: 711-6.
- Zehbe I., Richard C., DeCarlo C.A., Shai A., Lambert P.F., Lichtig H., Tommasino M., Sherman L. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology* **2009**; 383: 69-77.
- Zhao K.N., Liu W. J., Frazer I.H. Codon usage bias and A+T content variation in human papillomavirus genomes. *Virus Res.* **2003**; 98: 95-104.
- Zhou J., Liu W.J., Peng S.W., Sun X.Y., Frazer I.H. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J. Virol.* **1999**; 73: 4972-82.

- **Zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2002**; 2: 342-50.
- **Zur Hausen H.** Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* **1989**; 49: 4677-81.
- **Zur Hausen H., De Villiers E.M., Gissmann L.** Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol. Oncol.* **1981**; 12: 124-8.